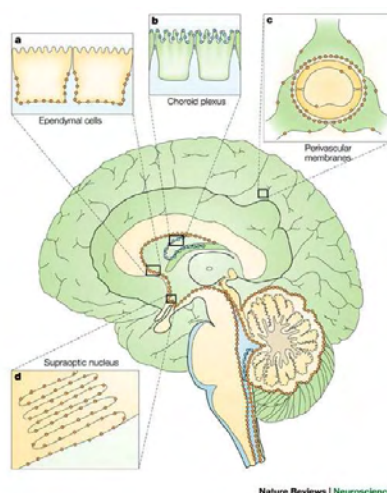




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



## **«Μελέτη γενετικής συσχέτισης tag SNPs του γονιδίου της AQP4 σε ασθενείς με ΚΕΚ»**



### **Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Δήμητρα Ν. Κρεμέτη

Ειδικευόμενη ιατρός

**Επιβλέπων καθηγητής:** Χατζηγεωργίου Γεώργιος, αναπληρωτής καθηγητής  
Νευρολογίας

**Λάρισα, 2012**

## **Τριμελής Επιτροπή:**

<b>Χατζηγεωργίου Γεώργιος,</b>	αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας
<b>Μολυβδάς Πασχάλης,</b>	Καθηγητής Φυσιολογίας
<b>Γερμενής Αναστάσιος,</b>	Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

# Περιεχόμενα

## Γενικό μέρος

• Περίληψη.....	σελ. 4
• Εισαγωγή στις κρανιεγκεφαλικές κακώσεις.....	σελ. 7
• Εγκεφαλικό οίδημα.....	σελ.10
• Εισαγωγή στις AQUAPORINES.....	σελ.13
• Aquaporin 4.....	σελ.17
• AQP4 και εγκεφαλικό οίδημα.....	σελ.25
• AQP4 και ισχαιμική - τραυματική εγκεφαλική βλάβη.....	σελ.28

## Ειδικό μέρος

• Σκοπός της μελέτης.....	σελ.32
• Ασθενείς και μέθοδος.....	σελ.32
• Τεχνικό μέρος.....	σελ.33
• Στατιστική ανάλυση.....	σελ.43
• Αποτελέσματα.....	σελ.44
• Συζήτηση.....	σελ.52

<b>Συμπεράσματα.....</b>	<b>σελ.55</b>
--------------------------	---------------

<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>σελ.56</b>
--------------------------	---------------

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

**Εισαγωγή:** Το εγκεφαλικό οίδημα αποτελεί καθοριστικό παράγοντα νοσηρότητας και θνητότητας μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση (ΚΕΚ). Η AQP4, μέλος της οικογένειας των μεμβρανικών διαύλων ύδατος των ακουαπορινών (AQPs), φαίνεται να αντιπροσωπεύει κύριο δίαυλο ύδατος του εγκεφάλου και βασικό ρυθμιστικό παράγοντα στη δημιουργία και απορρόφηση του οιδήματος μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση.

**Σκοπός:** Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση tag πολυμορφισμών του γονιδίου της AQP4 στη βαρύτητα της κλινικής εικόνας και την εξάμηνη έκβαση ασθενών μετά από ΚΕΚ. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 7 tag SNPs: οι rs335929, rs3763043, rs11661256, rs335931, rs3763040, rs4800773 και rs3875089.

**Μέθοδος:** Εξετάσθηκαν συνολικά 363 ασθενείς, 292 άνδρες και 71 γυναίκες. Η αρχική κλινική εικόνα κατά την εισαγωγή τους εκτιμήθηκε με την κλίμακα κώματος της Γλασκώβης (GCS) και η εξάμηνη έκβασή τους με τη χρήση της κλίμακας έκβασης της Γλασκώβης (GOS). Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της εξαλάτωσης, ενώ η ταυτοποίηση των γονοτύπων των πολυμορφισμών (SNPs) πραγματοποιήθηκε με PCR μεθόδους. Με βάση δεδομένα από το HapMap project για τους ευρωπαϊκούς καυκάσιους, επιλέχθηκαν tag SNPs κατά μήκος ολόκληρου του γονιδίου της AQP4 με τη βοήθεια του προγράμματος tagger. Η ισορροπία Hardy-Weinberg (H-W) εξετάσθηκε με τη χρήση του Fisher exact test. Έγινε υπολογισμός της ανισορροπίας σύνδεσης (κατά ζεύγη  $D'$  και  $r^2$ ) μεταξύ των πολυμορφισμών που μελετήθηκαν. Με βάση τη μέθοδο εκτίμησης της μεγίστης πιθανοφάνειας, κατασκευάστηκαν απλότυποι από tag SNPs αλληλόμορφα. Για την εκτίμηση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ μεμονωμένων tag SNPs ή των απλοτύπων που προέκυψαν από το συνδυασμό των αλληλομόρφων των tag-SNPs και έκβασης των ασθενών, χρησιμοποιήθηκαν μονοπαραγοντικά και πολυπαραγοντικά μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης, ενώ έγινε σταθεροποίηση των μοντέλων για το φύλο, την ηλικία και την GCS εισόδου. Η επίδραση γονοτύπων και αλληλομόρφων εξετάσθηκε με εφαρμογή του επικρατητικού, του

υπολειπόμενου μοντέλου κληρονόμησης και του μοντέλου αντίθεσης αλληλομόρφων. Τέλος, εφαρμόστηκε η διόρθωση Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις και ορίστηκε το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας στο  $p=0.008$ .

**Αποτελέσματα:** Από την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, ο πολυμορφισμός rs3763043 βρέθηκε να επηρεάζει την εξαμηνιαία έκβαση των ασθενών μετά από ΚΕΚ, σε στατιστικώς σημαντικά επίπεδα. Οι φορείς κατά το επικρατητικό μοντέλο κληρονόμησης, είχαν 2.39 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα ευνοϊκής έκβασης 6 μήνες μετά από ΚΕΚ ( $OR=2.39(1.25-4.58)$  και  $p=0.008$ ), με βάση το πολυπαραγοντικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από τη σύγκριση συχνοτήτων αλληλομόρφων ( $OR=2.30(1.38-3.83)$  και  $p=0.001$ ) και από το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονόμησης ( $OR\ 5,15\ (1.60-16.5)$  και  $p=0.006$ ). Για τους πολυμορφισμούς rs335931 και rs11661256, με την εφαρμογή του πολυπαραγοντικού μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης, διαφάνηκε μια τάση για δυσμενή έκβαση των ασθενών 6 μήνες μετά από ΚΕΚ, κατά το μοντέλο αντίθεσης αλληλομόρφων και κατά το επικρατητικό μοντέλο. Επίσης, διαφάνηκε αυξημένος κίνδυνος δυσμενούς εξαμηνιαίας έκβασης μετά από ΚΕΚ για τον rs3875089 πολυμορφισμό, με την εφαρμογή του ίδιου μοντέλου. Τέλος, διαπιστώθηκε ότι, οι φορείς του απλότυπου VI (ATTAGT) παρουσίαζαν περισσότερες πιθανότητες για καλύτερη μακροχρόνια έκβαση και στο μονοπαραγοντικό και στο πολυπαραγοντικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης.

**Συμπεράσματα:** Με την παρούσα μελέτη διαφάνηκε η πιθανότητα συμμετοχής πολυμορφισμών της AQP4 στην έκβαση ασθενών μετά από ΚΕΚ. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες μελέτες για την επιβεβαίωση των παραπάνω συσχετίσεων, με τελικό σκοπό την καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας της σημαντικής αυτής πρωτεΐνης και, κυρίως, των κλινικών επιπτώσεών της.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΚΡΑΝΙΟΕΓΚΕΦΑΛΙΚΕΣ ΚΑΚΩΣΕΙΣ (ΚΕΚ)**

Το εγκεφαλικό τραύμα αποτελεί διεθνώς σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας. Ενδεικτικά αναφέρεται πως στην Ελλάδα, κάθε χρόνο, εισάγονται στα νοσοκομεία περίπου 35.000 άτομα με κρανιοεγκεφαλική κάκωση (ΚΕΚ), με τις βαριές ΚΕΚ λόγω τροχαίων ατυχημάτων να αποτελούν την πρώτη αιτία μόνιμης αναπηρίας και θανάτου στις νέες ηλικίες (19-25 έτη). Οι περισσότερες ΚΕΚ είναι κλειστές (μη διατιτραίνουσες) – οι ανοιχτές κακώσεις συμβαίνουν συνήθως μετά από πυροβολισμό.

Ο τραυματισμός του εγκεφάλου μετά από ΚΕΚ είναι αποτέλεσμα δύο διακριτών διαδικασιών: της άμεσης βλάβης (impact damage), που προέρχεται από τις μηχανικές δυνάμεις που εφαρμόζονται στο κρανίο και στον εγκέφαλο τη στιγμή της πρόσκρουσης (περιλαμβάνονται οι εγκεφαλικές θλάσεις, τα κατάγματα των οστών, οι θλάσεις εγκεφαλικού στελέχους, η διάχυτη αξονική βλάβη) και του δευτερογενούς τραυματισμού (secondary injury), επακόλουθου των πολύπλοκων διεργασιών που επάγονται από την αρχική βλάβη (περιλαμβάνονται τα ενδοκρανιακά αιματώματα/αιμορραγία, το οίδημα, η υποξαιμία, η ισχαιμία, η ενδοκράνια υπέρταση). Η αλληλουχία των γεγονότων που συνεισφέρουν στην ανάπτυξη της δευτεροπαθούς εγκεφαλικής βλάβης μετά από ΚΕΚ δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Φαίνεται ότι εμπλέκονται ποικίλοι ενδογενείς παράγοντες οι οποίοι απελευθερώνονται στον ενδοκράνιο χώρο μετά το τραύμα, με τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις τους, όπως η αγγειοσύσπαση και η μειωμένη αιμάτωση, η απελευθέρωση κυτταροτοξικών ουσιών (ιόντα Ca, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου κ.α), η παραγωγή επιβλαβών πρωτεϊνών [1-4]. Παράλληλα, τελευταία, όλο και περισσότερο αναδεικνύεται ο ρόλος της φλεγμονώδους αντίδρασης στην παθογένεση της εγκεφαλικής βλάβης μετά από τραύμα [5-7], η οποία περιλαμβάνει τη διήθηση ανοσοποιητικών κυττάρων και τη δημιουργία οιδήματος στην περιοχή του τραύματος. Επιπλέον, ενεργοποιούνται

φλεγμονώδη εγκεφαλικά κύτταρα (αστροκύτταρα, μικρογλοία, ενδοθηλιακά κύτταρα), με αποτέλεσμα την παραγωγή ποικίλων φλεγμονωδών μορίων (συμπλήρωμα, πρωτεΐνες οξείας φάσης, προ-φλεγμονώδεις κυττοκίνες). Γενικότερα, όσο μεγαλύτερη είναι η έκταση της φλεγμονώδους αντίδρασης, τόσο μεγαλύτερη είναι και η βλάβη του εγκεφαλικού ιστού.

Η εγκεφαλική διάσειση αποτελεί μια παροδική λειτουργική εγκεφαλική βλάβη που προκαλείται μετά από βίαιο χτύπημα ή τράνταγμα του εγκεφάλου και εκδηλώνεται ως παροδική απώλεια των αισθήσεων. Μετά από ένα έντονο, γρήγορο χτύπημα το οποίο θέτει σε κίνηση την κεφαλή, η κίνηση του εγκεφάλου καθυστερεί (καθώς ο εγκέφαλος ουσιαστικά επιπλέει στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό). Αντιστοίχως, όταν η κίνηση της κεφαλής σταματήσει απότομα (πρόσκρουση σε κάποιο ακίνητο αντικείμενο), ο εγκέφαλος συνεχίζει την κίνησή του. Σε αντίθεση με τα εγκεφαλικά ημισφαίρια, το στέλεχος έχει μικρότερη δυνατότητα κίνησης, η διαφορά δε αυτή της μεγαλύτερης μετακίνησης των ημισφαιρίων σε σχέση με το στέλεχος μετά από κάκωση της κεφαλής είναι υπεύθυνη πιθανότατα για την παρατηρούμενη παροδική απώλεια συνείδησης.

Ο όρος εγκεφαλική θλάση αναφέρεται σε εστιακή εγκεφαλική βλάβη και οφείλεται στη δημιουργία μώλωπα στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Στην εγκεφαλική θλάση παρατηρείται μια μεγάλη ποικιλία παθολογικών αλλοιώσεων όπως τοπικό οίδημα, φλεγμονή, διάσχιση νευρικών ινών, πετεχειώδης εξαγγείωση αίματος ή μεγαλύτερη αιμορραγική διήθηση, οι οποίες οδηγούν σε παροδική (ή μονιμότερη) διαταραχή του επιπέδου συνείδησης του ασθενούς. Όσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια της απώλειας συνείδησης τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα να επιπροστίθενται στην εγκεφαλική διάσειση εγκεφαλικές θλάσεις, αιμορραγία, εντοπισμένο οίδημα.

Υπάρχουν περιπτώσεις τραυματισμών του εγκεφάλου, όπως για παράδειγμα περιπτώσεις πυροβολισμού, όπου δεν προκαλείται σημαντική μετατόπιση της κεφαλής ή του εγκεφάλου. Στις περιπτώσεις αυτές μπορεί να υπάρχει σοβαρός ή θανατηφόρος τραυματισμός, χωρίς άμεση απώλεια συνείδησης. Σε τραύματα τέτοιου τύπου οι κυριότερες βλάβες που προκαλούνται είναι η αιμορραγία και η καταστροφή του εγκεφαλικού ιστού, ενώ συχνή είναι και η



εμφάνιση λοίμωξης (μηνιγγίτιδα ή εγκεφαλικό απόστημα). Στις κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις επίσης, σημαντική είναι και η παρουσία καταγμάτων του κρανίου που απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή, καθώς φαινομενικά μικρές κακώσεις μπορεί να προκαλέσουν σοβαρά κατάγματα ενώ, αντίθετα, υπάρχουν βαριές διασείσεις ή θλάσεις χωρίς κατάγματα κρανίου.

Η παθοφυσιολογία των κρανιοεγκεφαλικών κακώσεων περιλαμβάνει:

α) Αλλαγές στην αιματική ροή του εγκεφάλου: Ο μηχανισμός της εγκεφαλικής αυτορρύθμισης διατηρεί την αιματική ροή του εγκεφάλου σταθερή σε φυσιολογικά επίπεδα εγκεφαλικής πίεσης αιμάτωσης, που κυμαίνονται από 50 έως 150 mmHg, εξασφαλίζοντας ότι μεγάλες αλλαγές στην συστηματική αρτηριακή πίεση προκαλούν μόνο μικρές αλλαγές στην εγκεφαλική αιματική ροή. Φαίνεται πως μετά από ΚΕΚ ο μηχανισμός της αυτορρύθμισης διαταράσσεται, με αποτέλεσμα ο εγκέφαλος να είναι πιο επιρρεπής σε ισχαιμία (λόγω χαμηλής πίεσης αιμάτωσης, με μειωμένη αιματική ροή) και σε αυξημένη ενδοκράνια πίεση (λόγω υψηλής πίεσης αιμάτωσης, με αυξημένη αιματική ροή). Έχει βρεθεί ότι κατά την οξεία φάση της ΚΕΚ, υπάρχει μια περίοδος μειωμένης αιματικής ροής, ενώ στις 3 πρώτες μέρες μετά την κάκωση παρατηρείται φυσιολογική ή αυξημένη αιματική ροή, η οποία συνοδεύεται συνήθως από χαμηλό μεταβολικό ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου [8].

β) Δυσλειτουργία του μεταβολισμού του εγκεφάλου: Υπάρχουν μελέτες που φανερώνουν είσοδο του εγκεφάλου σε μια κατάσταση αυξημένου μεταβολισμού της γλυκόζης (hyperglycolytic state), η οποία παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά από ΚΕΚ [9], καθώς και μείωση του οξειδωτικού μεταβολισμού στα μιτοχόνδρια του εγκεφάλου. Παρατηρείται επίσης μείωση της συγκέντρωσης του Ν-ακετυλο-ασπαρτικού οξέος (που συντίθεται στα μιτοχόνδρια και απαντάται στους νευρώνες), η οποία σχετίζεται με τη σοβαρότητα της κάκωσης και πιθανό να αποτελεί δείκτη της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων [10,11]. Η παρατηρούμενη μεταβολική δυσλειτουργία μπορεί να οφείλεται και στην ευαισθησία του τραυματισμένου εγκεφάλου σε σχετικά μικρές αλλαγές στη διαθεσιμότητα του οξυγόνου. Επίσης, σε μελέτες με πειραματικά μοντέλα που υπέστησαν ήπια και σοβαρή

ΚΕΚ, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα γλουταμικού οξέος [12,13], καθώς και αυξημένα επίπεδα τοξικών αμινοξέων. Τα επίπεδα αυτά ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με σοβαρή ΚΕΚ, εγκεφαλικές θλάσεις ή δευτεροπαθή ισχαιμικά επεισόδια [14].

γ) Διαταραχή της ενδοκυττάριας ομοιόστασης του ασβεστίου ( $\text{Ca}^{+2}$ ), με την ενεργοποίηση των NMDA (N-methyl-D-aspartate) υποδοχέων μετά από ΚΕΚ [12,13] και επακόλουθη συνεχή αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου, που προκαλεί με τη σειρά της ενεργοποίηση πρωτεασών, όπως φωσφολιπάσες, νουκλεάσες, υπεροξειδική δισμουτάση.

δ) Παραγωγή ελευθέρων ριζών (υπεροξειδικών και υδροξυλικών) εντός ολίγων λεπτών από την ΚΕΚ, που συνεισφέρει στην προκαλούμενη κυτταρική βλάβη [15]. Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν υπεροξειδωση των λιπιδίων με επακόλουθη αναστολή της δράσης των ενζύμων που εξαρτώνται από τα φωσφολιπίδια και αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης (έως και καταστροφή της).

ε) Επίδραση στον κυτταροσκελετό: η ΚΕΚ οδηγεί σε αξονική βλάβη και καταστροφή του κυτταροσκελετού, πιθανόν μέσω ενεργοποίησης της πρωτεάσης καλπαΐνης (calpain) από τα αυξημένα επίπεδα του ενδοκυττάριας ασβεστίου (μη αναστρέψιμη ενεργοποίηση) [16,17]. Μελέτες, μάλιστα, σε μοντέλα τρωκτικών που υπέστησαν ΚΕΚ, έδειξαν βελτίωση της νευρολογικής έκβασης με την αναστολή της δράσης της καλπαΐνης [18,19].

στ) Εγκεφαλικό οίδημα και ισχαιμία: οι δύο αυτές παράμετροι αναλύονται ακολουθώντας εκτενέστερα λόγω της ιδιαίτερης σημασίας τους στην πορεία, πρόγνωση και έκβαση της κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης.

## **ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟ ΟΙΔΗΜΑ**

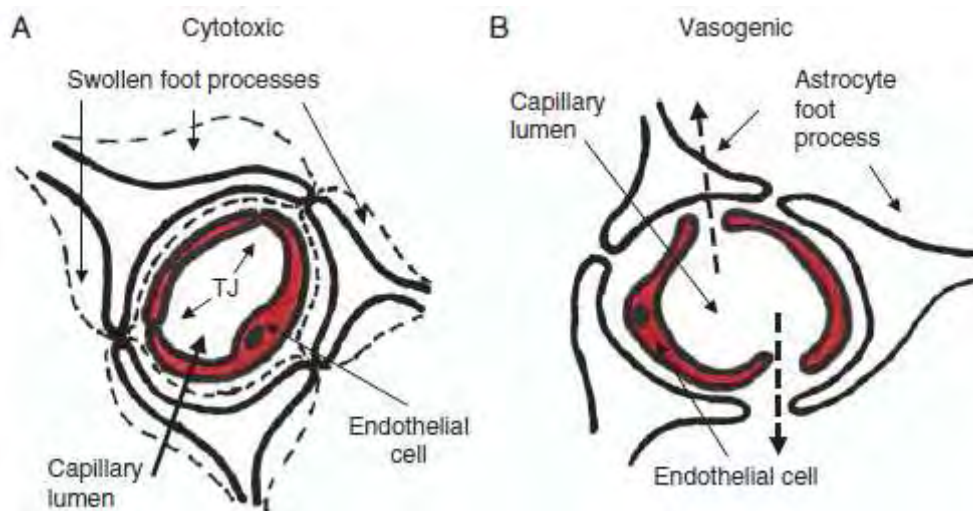
Το εγκεφαλικό οίδημα ορίζεται ως η εκσεσημασμένη συσσώρευση ύδατος στους ενδοκυττάριας ή/και εξωκυττάριας χώρους του εγκεφάλου και αποτελεί το τελικό συμβάν σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις, όπως η ΚΕΚ,

η ισχαιμία, οι όγκοι. Ο Klatzo (1994) περιέγραψε δύο διακριτούς τύπους εγκεφαλικού οιδήματος ανάλογα με την παθογένεσή τους: το αγγειοκινητικό και το κυτταροτοξικό. Στις περισσότερες ανθρώπινες παθήσεις όπου αναπτύσσεται εγκεφαλικό οίδημα απαντώνται και οι δύο μορφές, αν και ένας είναι ο επικρατών τύπος, αναλόγως της πάθησης. Για πολλά χρόνια το αγγειοκινητικό οίδημα θεωρούνταν ο κυρίαρχος τύπος οιδήματος μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση. Η χρήση ωστόσο μηχανικών μοντέλων ΚΕΚ και μαγνητικής τομογραφίας αποκάλυψε ότι και το κυτταροτοξικό οίδημα έχει καθοριστική σημασία μετά από ΚΕΚ, καθώς αναπτύσσεται νωρίς και επιμένει ενώ η ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού αποκαθίσταται [20]. Στη μελέτη, για παράδειγμα, των Bartzo et al., 1997, παρατηρήθηκε μείωση της διάχυσης ύδατος 45 min μετά από πειραματική ΚΕΚ, με επακόλουθο εκτεταμένο ενδοκυττάριο οίδημα, που παρέμεινε για 2 εβδομάδες μετά τη βλάβη [21]. Σπάνια μετά από ΚΕΚ μπορούμε να συναντήσουμε και «υδροκεφαλικό/ενδιάμεσο» οίδημα σχετιζόμενο με απόφραξη στη ροή του εγκεφαλονωτιαίου υγρού [22].

Το κυτταροτοξικό οίδημα εμφανίζεται όταν εγκεφαλικά κύτταρα βλάπτονται και η αποτυγχάνει η Na/K+ ΑΤΡάση, χωρίς να επηρεάζεται η ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (εικ.1). Επίσης, δημιουργείται σε υπονατριαιμία όταν προκαλείται ωσμωτική κλίση μεταξύ πλάσματος και εγκεφάλου. Στο κυτταροτοξικό οίδημα περιορίζεται το ενδιάμεσο διαμέρισμα και επεκτείνεται το ενδοκυττάριο διαμέρισμα. Το οιδηματώδες υγρό συσσωρεύεται στη φαιά και λευκή ουσία. Αν και όλα τα εγκεφαλικά κύτταρα διογκώνονται λόγω του κυτταροτοξικού οιδήματος, τα αστροκύτταρα παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη εξοίδηση [24] λόγω των μοναδικών μεμβρανικών τους μεταφορέων, συμπεριλαμβανομένης και της AQP4, καθώς και της υπεροχής τους στον ανθρώπινο εγκέφαλο όπου επικρατούν των νευρώνων κατά 10:1 [23, 24, 25].

Το αγγειοκινητικό οίδημα εμφανίζεται όταν διασπάται ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός, με αποτέλεσμα αθρόα ροή ύδατος από την κυκλοφορία του αίματος στον εγκέφαλο (εικ.1). Το πλεονάζον ύδωρ, μαζί με πρωτεΐνες του πλάσματος και ηλεκτρολύτες, επεκτείνει το ενδιάμεσο διαμέρισμα (Papadopoulos et

al.,2005). Στο αγγειοκινητικό οίδημα το πλεονάζον υγρό εντοπίζεται στη λευκή ουσία (η φαιά διασώζεται).



**Εικόνα 1:** Κυτταροτοξικό και αγγειοκινητικό εγκεφαλικό οίδημα. Α) Η παθολογική εξοίδηση των τελικών αποφύσεων των αστροκυττάρων αποτελεί χαρακτηριστικό του κυτταροτοξικού οιδήματος. Οι στενές συνάψεις (TJ) συμβάλλουν στην ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (ΑΕΦ). Β) Η διάσπαση του ΑΕΦ επιτρέπει την έξοδο υγρού από τα εγκεφαλικά τριχοειδή στον εξωκυττάριο χώρο, οδηγώντας σε αγγειοκινητικό οίδημα.

Το εγκεφαλικό οίδημα προκαλεί αύξηση της ενδοκράνιας πίεσης, η οποία μειώνει την εγκεφαλική πίεση αιμάτωσης, προκαλώντας εγκεφαλική ισχαιμία [26-28]. Μελέτες σε εγκεφάλους ασθενών που υπέστησαν ΚΕΚ επιβεβαιώνουν την παρουσία ισχαιμικής βλάβης, γεγονός που φανερώνει ότι ο τραυματισμένος εγκεφαλικός ιστός είναι ευαίσθητος στην ανάπτυξη ισχαιμίας. Η ισχαιμία, δε, αποτελεί σημαντικό στοιχείο δευτεροπαθούς βλάβης μετά από ΚΕΚ. Το εγκεφαλικό οίδημα, εκτός από ισχαιμία, μπορεί να προκαλέσει επίσης εγκολεασμό, με αποτέλεσμα συμπίεση μεγάλων εγκεφαλικών αγγείων και τελικά, ακόμη και θάνατο.

Η ανάπτυξη εγκεφαλικού οιδήματος έχει σημαντική επίδραση στη νοσηρότητα και θνητότητα μετά από ΚΕΚ, με τους μοριακούς και κυτταρικούς μηχανισμούς που συμμετέχουν στην ανάπτυξη/απορρόφηση του τραυματικού

εγκεφαλικού οιδήματος να μην είναι πλήρως κατανοητοί και να μην διατίθενται έως σήμερα φάρμακα που να στοχεύουν αποκλειστικά στη ρύθμιση της ομοιόστασης του ύδατος στο εγκέφαλο [22]. Ωστόσο, η ανακάλυψη των ακουαπορινών (**aquaporines**), μιας οικογένειας μεμβρανικών διαύλων ύδατος, άνοιξε νέους δρόμους στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας του εγκεφαλικού οιδήματος. Ξεχωριστός είναι ο ρόλος της **AQP4**, της κατεξοχήν ακουαπορίνης του εγκεφάλου, που εντοπίζεται κυρίως στις τελικές αποφύσεις των αστροκυττάρων, στα όρια μεταξύ εγκεφαλικού παρεγχύματος και μεγάλων υγρών διαμερισμάτων, όπως διαφάνηκε από μελέτες σε ποντίκια με έλλειψη AQP4. Η κατανομή αυτή δείχνει το ρόλο της AQP4 στον έλεγχο της διακίνησης ύδατος εντός και εκτός του εγκεφαλικού παρεγχύματος. Επιγραμματικά, μπορούμε να αναφέρουμε ότι στο κυτταροτοξικό οίδημα, η έλλειψη της επιβραδύνει την είσοδο ύδατος στον εγκέφαλο, ενώ στο αγγειοκινητικό οίδημα, η έλλειψη της μειώνει την απομάκρυνση ύδατος από το εγκεφαλικό παρέγχυμα, παίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του κυτταροτοξικού και στην απορρόφηση του αγγειοκινητικού εγκεφαλικού οιδήματος. Τα ανωτέρω ευρήματα άνοιξαν νέους δρόμους στην αναζήτηση θεραπείας του τραυματικού (και όχι μόνο) εγκεφαλικού οιδήματος [22].

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ AQUAPORINES**

Το ύδωρ είναι το βασικό συστατικό όλων των ζωντανών κυττάρων γι' αυτό και αναφέρεται ως η «ουσία» της ζωής. Η διακίνηση ύδατος διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών, διατηρεί την ωσμωτικότητα του κυτταροπλάσματος και, κατά συνέπεια, την ακεραιότητα των κυττάρων. Η όλη διαδικασία της ανταλλαγής ύδατος αποτέλεσε αντικείμενο εντατικής μελέτης κατά τη διάρκεια των τελευταίων δέκα χρόνων. Παρατηρήσεις σε πειραματικά συστήματα, όπως ερυθροκύτταρα θηλαστικών, οδήγησαν στη διαπίστωση πως δεν αρκεί η απλή διάχυση ύδατος δια των λιπιδικών μεμβρανών για να εξηγήσει την υψηλή ταχύτητα ανταλλαγής ύδατος που διαπιστώνεται και έδωσαν ώθηση

στην έρευνα για την ανακάλυψη ειδικών διαύλων ύδατος στις κυτταρικές μεμβράνες. Σήμερα έχει πλέον τεκμηριωθεί ο ρόλος της οικογένειας των ακουαπορινών (**aquaporins AQP**s), ως βασικών διαμεμβρανικών διαύλων ύδατος, ευρέως απαντώμενων τόσο σε πολυκυττάριους (άνθρωποι, ζώα, φυτά) όσο και σε μονοκυττάριους οργανισμούς (βακτήρια, ζύμες, πρωτόζωα) [29], γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία τους ως διαύλων, για τη ζωή. Οι ακουαπορίνες είναι μια οικογένεια μικρών, υδρόφοβων, διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που απαριθμεί, έως σήμερα, 13 μέλη (AQP0-AQP12). Έντεκα από αυτά έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορους ιστούς θηλαστικών, όπως το νευρικό σύστημα, οι νεφροί, η γαστρεντερική οδός, το δέρμα και το αναπνευστικό σύστημα [30]. Η εντόπιση τους αφορά, συνήθως, επιθήλια όπου πραγματοποιείται ταχεία διακίνηση ύδατος (πίνακας 1). Η AQP1, ο πρώτος δίαυλος ύδατος που χαρακτηρίστηκε λειτουργικά από την ομάδα του δρ. Peter Agre, απομονώθηκε από μεμβράνες ερυθρών αιμοσφαιρίων και εγγύς νεφρικών σωληναρίων ως μια πρωτεΐνη 28-kDa που αύξανε τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών, σαν απάντηση σε ωσμωτικές κλίσεις. Η σπουδαιότητα της ανακάλυψης χάρισε στο δρ. Agre το βραβείο Nobel στη Χημεία το 2003 [22].

**Πίνακας 1:** Έκφραση AQPs

AQPS	Έκφραση σε ιστούς
AQP0	Οφθαλμικοί φακοί
AQP1	Ερυθρά αιμοσφαίρια, νεφρικά σωληνάκια, πνεύμονες, περιφερικό και κεντρικό νευρικό σύστημα
AQP2	Νεφρικά αθροιστικά σωληνάκια
AQP3	Νεφρικά αθροιστικά σωληνάκια, δέρμα, επιπεφυκότας, οισοφάγος, κόλον, σπλήνας, στόμαχος, λεπτό έντερο, ουροδ. κύστη, αναπνευστικό επιθήλιο
AQP4	Αστρογλοιακά κύτταρα στον εγκέφαλο και Ν.Μ, νεφρικό αθροιστικό σωληνάριο, επιθήλια αδένων, αεραγωγοί, σκελετικοί μυς, στόμαχος, αμφιβληστροειδής
AQP5	Αδενικά επιθήλια, κερατοειδής, κυψελιδικό επιθήλιο, γαστρεντερικό σύστημα
AQP6	Διάμεσα κύτταρα του νεφρικού αθροιστικού σωληναρίου

AQP7	Λιπώδης ιστός, όρχεις, καρδιά, σκελετικοί μυς, εγγύς νεφρικό σωληνάριο
AQP8	Ήπαρ, πάγκρεας, σιελογόνοι αδένες, όρχεις, καρδιά
AQP9	Ήπαρ, λευκά αιμοσφαίρια, εγκέφαλος, όρχεις
AQP10	Λεπτό έντερο
AQP11	Νεφροί, όρχεις, καρδιά, ήπαρ, εγκέφαλος, έντερο, λιπώδης ιστός
AQP12	Παγρεατικά λοβιακά κύτταρα

Οι ακουαπορίνες παρουσιάζουν παρόμοια μοριακά βάρη (~30 kDa) και ομολογία αμινοξέων κυμαινόμενη από 20%-50% [22]. Ενώ λειτουργούν κατεξοχήν ως διάυλοι ύδατος, κάποιες από τις ακουαπορίνες βρέθηκε να παρουσιάζουν, επίσης, διαπερατότητα σε ουσίες, όπως η γλυκερόλη, η αμμωνία, η ουρία, το διοξείδιο του άνθρακα κ.α.[31]. Με βάση την ομολογία αλληλουχίας αμινοξέων τους και την εκλεκτικότητά τους, έχουν ταξινομηθεί στις ακόλουθες κατηγορίες:

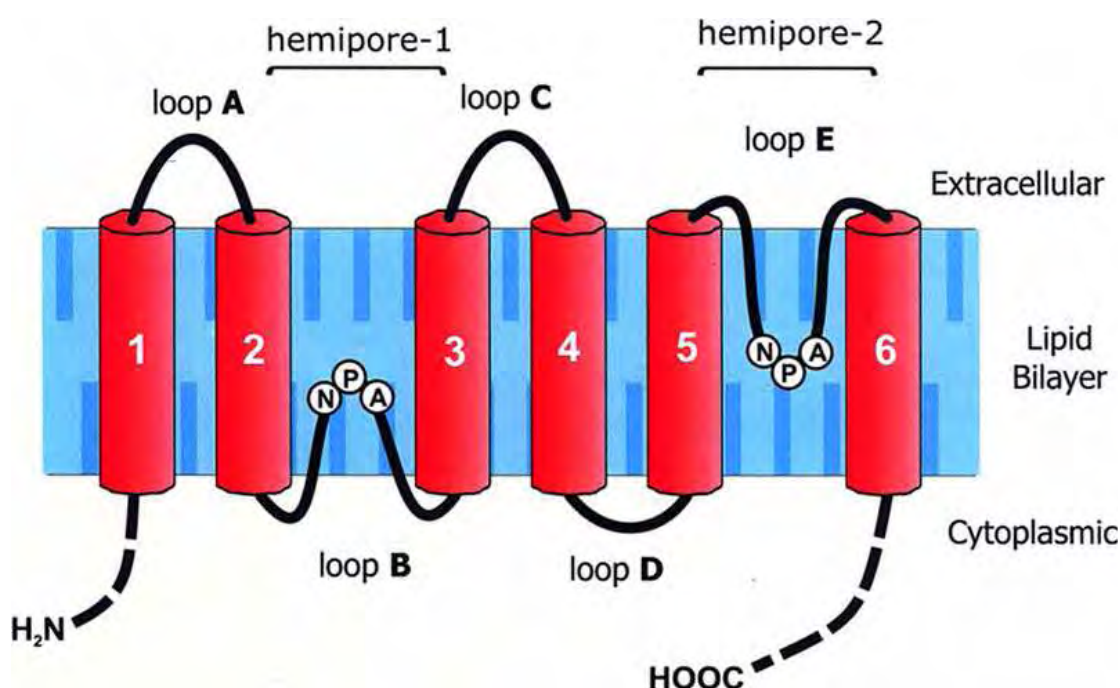
A) Aquaporins : περιλαμβάνονται οι AQP 0, 1, 2, 4, 5, 6 και 8 που αποτελούν την οικογένεια των «καθαρών διαύλων ύδατος», διαπερατών κατεξοχήν μόνο σε νερό, με υψηλή ταχύτητα ροής. Ωστόσο, υπάρχουν εξαιρέσεις, όπως η AQP 6, 8 και 1, που είναι επίσης διαπερατές σε ανιόντα, ουρία και πτητικές ουσίες (CO<sub>2</sub>) , αντίστοιχα [30,32].

B) Aquaglyceroporins: περιλαμβάνονται οι AQP 3, 7, 9 και 10. Εκτός από τη διαπερατότητά τους σε ύδωρ, τα μέλη της υποκατηγορίας αυτής είναι επίσης διαπερατά σε γλυκερόλη, ουρία και κάποια μονοκαρβοξυλικά [32].

Γ) Super- AQPs (ή «ανορθόδοξες AQPs» - τελευταία έχει προταθεί ως υποκατηγορία): περιλαμβάνονται οι AQP 11 και 12, που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα. Ο ρόλος τους δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί αλλά φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση της ενδοκυττάριας μεταφοράς ύδατος, του όγκου των οργανιδίων και της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης [22].

Οι λειτουργικές AQPs διαμορφώνονται στις κυτταρικές μεμβράνες ως τετραμερή, με ενδοκυττάρια αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα. Η διαμόρφωση της AQP1 αντανakλά τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά της οικογένειας των ακουαπορινών. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από περίπου 270 αμινοξέα και περιλαμβάνει 6 διαμεμβρανικές περιοχές α- έλικας, με μια

ανεστραμμένη συμμετρία μεταξύ των πρώτων και τελευταίων τριών περιοχών. Οι δυο συνδετικοί βρόγχοι μεταξύ των διαμεμβρανικών ελίκων 2-3 και 5-6 περιέχουν μια τριπλέτα αμινοξέων με αλληλουχία NPA ( Asn-Pro-Ala) που διατηρείται σε όλα τα μέλη της οικογένειας και εμπλέκεται στη δημιουργία του πόρου και στην εκλεκτικότητα της διακίνησης ύδατος [33,34] (εικόνα 2).



**Εικόνα 2:** Μεμβρανική τοπολογία μιας υπομονάδας AQP. Οι AQPs είναι τετραμερείς πρωτεΐνες. Κάθε μονομερές αποτελείται από 6 διαμεμβρανικά επεκτεινόμενες περιοχές που συνδέονται με βρόγχους (A-E), με κυτταροπλασματικά NH<sub>2</sub>- και CO<sub>2</sub>- άκρα. Τα υψηλά συντηρημένα μοτίβα NPA στους βρόγχους B και E διαμορφώνουν τον εκλεκτικό πόρο ύδατος [34].

Σε αντίθεση με τους περισσότερους διαύλους ιόντων, η διακίνηση δεν βρίσκεται στον άξονα της συμμετρίας που δημιουργείται από τις 4 υπομονάδες, αλλά κάθε μονομερές περιέχει ξεχωριστούς πόρους, ώστε τελικά κάθε AQP να περιλαμβάνει 4 διαύλους διακίνησης ύδατος [30]. Στις λιπιδικές



διπλοστοιβάδες οι πρωτεΐνες δημιουργούν πόρους με διάμετρο μεταξύ 3 και 6 Å και η εκλεκτικότητα στο ύδωρ φαίνεται να οφείλεται στη διάμετρο του πόρου. Επιπρόσθετα, καθώς κάτω από διαφορετικές συνθήκες τα κύτταρα μπορούν να προσλαμβάνουν ή να αποβάλλουν ύδωρ, οι AQPs ως εκλεκτικοί δίαυλοι ύδατος θα πρέπει να λειτουργούν ως δίαυλοι διπλής κατεύθυνσης.

Αν και η διακίνηση ύδατος διαμέσω των AQPs κατευθύνεται από ωσμωτικές κλίσεις, υπάρχουν στοιχεία για τη ρυθμιστική συμμετοχή και εξωτερικών παραγόντων. Η διαπερατότητα της AQP3 μειώνεται σε όξινο pH, ενώ η διαπερατότητα της AQP6 σε ύδωρ και ιόντα, ενισχύεται σε παρόμοιες συνθήκες [35]. Έχει επίσης αναφερθεί πως η διαπερατότητα της AQP4 μειώνεται μετά από ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C [30]. Είναι ακόμα γνωστό πως πολλές ανθρώπινες AQPs είναι ευαίσθητες στην ανασταλτική δράση ουσιών που περιέχουν υδράργυρο. Πρώιμες μελέτες έχουν δείξει πως η AQP1 έχει ένα υπόλειμμα κυστεΐνης (C189) κοντά στο NPA μοτίβο και μετάλλαξη σε αυτή οδηγεί σε απώλεια της αναστολής από υδράργυρο [66]. Σε αντίθεση, η θεωρούμενη «αναίσθητη» στον υδράργυρο AQP4, στερείται κυστεΐνης αντίστοιχης της C189 της AQP1 [36]. Ωστόσο, ένα άλλο βαρύ μέταλλο, ο μόλυβδος, βρέθηκε πρόσφατα πως προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας της AQP4 σε ύδωρ [37], γεγονός που μπορεί έχει σημαντικές κλινικές επιπτώσεις, καθώς η οξεία δηλητηρίαση από μόλυβδο σχετίζεται με εγκεφαλικό οίδημα.

## **AQUAPORIN 4**

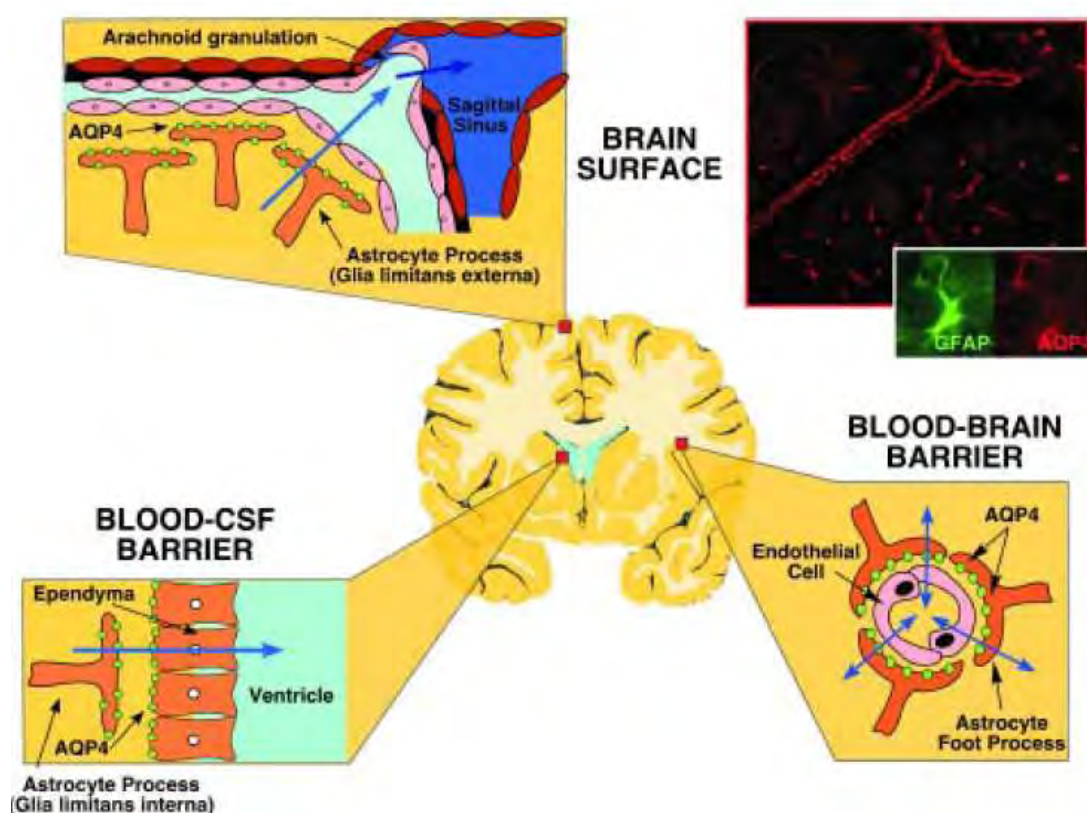
Η πρόσφατη ταυτοποίηση των AQPs έχει συμβάλλει στην κατανόηση της διακίνησης ύδατος σε πολλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Καθώς μάλιστα το εγκεφαλικό οίδημα (ανώμαλη συσσώρευση πλεονάζοντος ύδατος στον εγκέφαλο) συνεχίζει να αποτελεί βασική αιτία θανάτου σε διάφορες παθήσεις του ΚΝΣ (όπως η εγκεφαλική ισχαιμία, η κρανιοεγκεφαλική κάκωση, όγκοι, λοιμώξεις), το

ενδιαφέρον για τις AQRs και τη λειτουργική συμμετοχή τους στην ισορροπία του ύδατος, σχετίζεται με τον πιθανό θεραπευτικό τους ρόλο στη αντιμετώπιση του εγκεφαλικού οιδήματος [38].

Πρόσφατα 7 υπότυποι AQRs έχουν περιγραφεί σε κύτταρα του εγκεφάλου τρωκτικών ( AQR 1, 3, 4, 5, 8, 9, 12) [20]. Φαίνεται, όμως, πως η AQR4 αποτελεί τον κυρίαρχο δίαυλο ύδατος στον εγκέφαλο των θηλαστικών, με 3 διακριτούς ρόλους στην εγκεφαλική λειτουργία, όπως καταγράφουν οι Verkman et al., με βάση φαινοτυπικές αναλύσεις σε διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών με έλλειψη του γονιδίου της AQR4: συμμετοχή στο εγκεφαλικό οίδημα, στη μετανάστευση νευρογλοιακών κυττάρων και στη νευρωνική σηματοδότηση [39]. Συγκεκριμένα, η AQR4 διευκολύνει σημαντικά τη διακίνηση ύδατος εντός και εκτός του εγκεφάλου κατά τη δημιουργία και απορρόφηση του εγκεφαλικού οιδήματος και η ρύθμιση της έκφρασης/λειτουργικότητάς της εμπλέκεται στη γλοιώση (glial scar), δράση πιθανώς κλινικά σημαντική σε τραυματικές βλάβες, όγκους και λοιμώξεις. Επιπρόσθετα, πρόσφατα στοιχεία δείχνουν αύξηση του όγκου εξωκυττάριου χώρου σε έλλειψη AQR4 και επηρεασμένη επαναπρόσληψη  $K^+$  από AQR-null αστροκύτταρα, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με σημαντικές λειτουργικά αλληλεπιδράσεις διαύλων AQR4 -  $K^+$  [39].

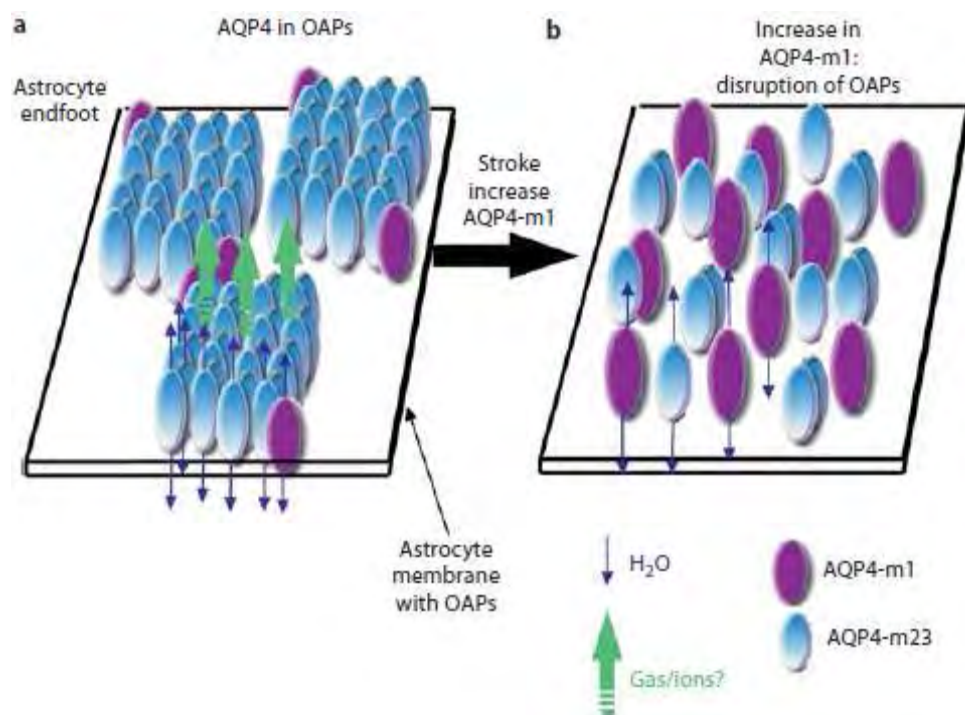
Η AQR4 εκφράζεται στα αστροκύτταρα και επενδυματικά κύτταρα του εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού, με υψηλή πόλωση. Εντοπίζεται κατεξοχήν στα τελικά αγγειακά πόδια των αστροκυττάρων που περιβάλλουν το ενδοθήλιο των εγκεφαλικών τριχοειδών, στα αστροκύτταρα στο περιοριστικό όριο της νευρογλοίας που επενδύει τις φλοιϊκές και κοιλιακές επιφάνειες, καθώς και στην πλαγιοβασική μεμβράνη του κοιλιακού επενδύματος [40](εικ.3). Η πολωμένη δε έκφρασή της στα όρια του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και της επιφάνειας αλληλεπίδρασης εγκεφάλου-εγκεφαλονωτιαίου υγρού, τονίζει το σημαντικό λειτουργικό της ρόλο στη διακίνηση ύδατος εντός και εκτός του εγκεφαλικού παρεγχύματος, μέσω ενίσχυσης της διαμεμβρανικής ροής ύδατος στα αστροκύτταρα. Επιπλέον, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον ως προς το μοριακό μηχανισμό της πολωμένης έκφρασης της AQR4, με την α-συντροφίνη (μια πρωτεΐνη ικριώματος, μέλος του DAP

συμπλέγματος (dystrofin-associated protein complex)) να παίζει βασικό ρόλο στον εντοπισμό της AQP4 στα τελικά αγγειακά πόδια των αστροκυττάρων [34].



**Εικόνα 3:** Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών διακίνησης ύδατος στον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό, στην επιφάνεια του εγκεφάλου και στην επιφάνεια των κοιλιών, μέσω μεμβρανών πλούσιων σε AQP4. Στη μικροφωτογραφία ανοσοφθορισμού (πάνω δεξιά) απεικονίζεται ο εγκέφαλος ενός αγρίου τύπου ποντικίου, σημασμένος με anti-AQP4 αντισώματα που συνδέονται στο κοιλιακό επένδυμα και τα περιβάλλοντα μικροαγγεία στην υποκοιλιακή λευκή ουσία. Στο ένθετο απεικονίζεται ένα μεμονωμένο αστροκύτταρο σημασμένο με anti-GFAP και anti-AQP4 αντισώματα και καταγράφεται η εντόπιση σήμανσης AQP4 στις περιαγγειακές τελικές αποφύσεις [40].

Η AQP4 έχει 2 ισομορφές ανάλογα με την εναρκτήρια της μετάφρασης μεθειονίνη: τη M1 (Met1 – 301 αμινοξέα) και τη M23 (Met23 – 323 αμινοξέα) [41]. Πρόσφατα οι Moet et al (2008) πρόσθεσαν 4 νέες ισομορφές: AQP4d, AQP4f, AQP4b, AQP4e. Οι τρεις πρώτες στερούνται του εξονίου 2 και έχουν ενδοκυττάρια εντόπιση στις κυτταρικές σειρές, ενώ δεν διακινούν ύδωρ όταν εκφράζονται σε ωκύτταρα *Xenopus* [22]. Η ενδογενής AQP4 είναι ένα τετραμερές αποτελούμενη από M1 και M23 υπομονάδες. Στον εγκέφαλο η M23 μορφή είναι τουλάχιστον τρεις φορές πιο άφθονη. Η M23 ισομορφή φτιάχνει υψηλής οργάνωσης διατάξεις, τις λεγόμενες ορθογώνιες διατάξεις μορίων (OAPs, orthogonal arrays of particles), ενώ η M1 ισομορφή παρουσιάζεται ως ανεξάρτητα τετραμερή. Ο σχηματισμός των OAPs από τη M23 σταθεροποιείται με υδρόφοβες ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που περιλαμβάνουν αμινοτελικά υπολείμματα και η απουσία OAPs στη M1 μορφή δικαιολογείται από μη εκλεκτικό μπλοκάρισμα τέτοιων αλληλεπιδράσεων από 7 υπολείμματα πάνω από τη μεθειονίνη 23 [42]. Η αναλογία M1:M23 ισομορφών καθορίζει το μέγεθος των OAPs στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες [43]. Η ακριβής σημασία της διάταξης σε OAPs δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Πιθανότατα αυξάνουν τη διαπερατότητα σε ύδωρ των μεμονωμένων διαύλων AQP4 μέσα στη διάταξη [44] και διευκολύνουν την αγκυροβόληση της AQP4 [25]. Κατ'επέκταση, παράγοντες που επηρεάζουν την επιλογή της θέσης έναρξης της μετάφρασης θα μπορούσαν να ρυθμίζουν το μέγεθος των OAPs και συνεπώς τη διαπερατότητα των κυττάρων σε ύδωρ [22]. (εικόνα 4)



**Εικόνα 4:** α) Η σχέση M1 και M23 ισομορφών συμβάλλει στο σχηματισμό των OAPs. Υψηλότερη έκφραση M23 συμβάλλει στο σχηματισμό μεγαλύτερων OAPs, με τα μεγαλύτερα OAPs να συμμετέχουν στη διακίνηση αερίων και κατιόντων στις μεμβράνες των αστροκυττάρων, μέσω των κεντρικών πόρων. β) Αύξηση της AQP-M1, όπως π.χ μετά από εγκεφαλικό, οδηγεί σε διατάραξη των OAPs [20].

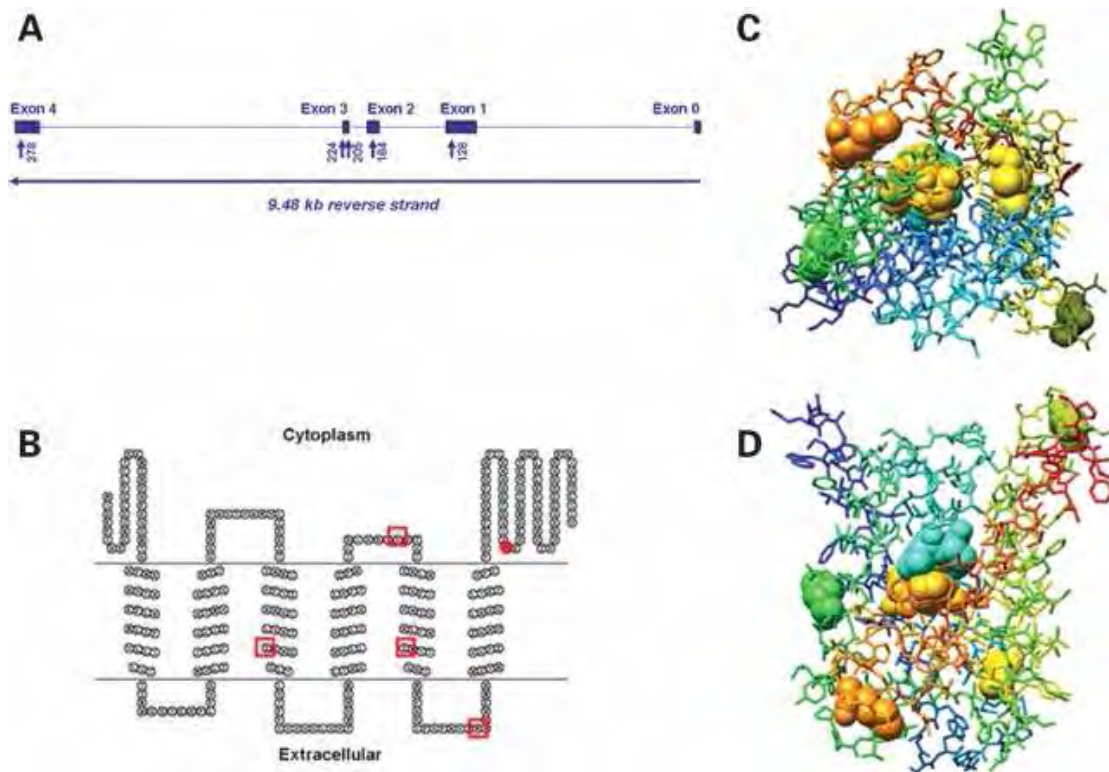
Το γονίδιο της ανθρώπινης AQP4 (18q11.2-q12.1) είναι υψηλά συντηρημένο, παρουσιάζοντας ομολογία αλληλουχίας μεγαλύτερη από 90% με ορθόλογα ποντικών και αρουραίων. Αποτελείται από 5 κωδικοποιητικά εξόνια (22, 127, 55, 27 και 92 αμινοξέων) που διαχωρίζονται από ιντρόνια 2.7, 0.8, 0.3, 5.2 kb. Μεγάλο κομμάτι της γενετικής έρευνας επικεντρώνεται τελευταία στη διερεύνηση πολυμορφισμών του γονιδίου της AQP4 και της ενδεχόμενης συσχέτισής τους με φαινοτύπους ασθενειών. Στους ανθρώπους είχε μέχρι πρόσφατα περιγραφεί μόνο ένας φυσικός μη-συνώνυμος μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (nsSNP, M278T), χωρίς λειτουργικό χαρακτηρισμό (δηλαδή, σε σχέση με τη λειτουργία της πρωτεΐνης ή κάποιο παθολογικό φαινόμενο) [45]. Ενδεικτικά των μελετών αναφέρουμε την πρόσφατη μελέτη των Sorani et al., 2008, όπου εξετάσθηκε το DNA 188 ατόμων διαφόρων εθνοτήτων και καταγράφηκαν 24 παραλλαγές της AQP4 (μετά από sequencing των 5

εξονίων), μεταξύ των οποίων και 4 νέοι μη-συνώνυμοι SNPs (nsSNPs: I128T, D184E, I205L, M224T) [45]. Από αυτούς, ο I128T βρίσκεται στην διαμεμβρανική περιοχή, οι D184E και I205L στα όρια αγκύλης-έλικας και ο M224T σε αγκύλη (ο M228T βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο) (εικ. 5). Ποιοτικά οι Asp-Glu και Ile-Leu αντικαταστάσεις αντιπροσωπεύουν ελάσσονες χημικές αλλαγές, ενώ οι Ile-Thr και Met-Thr αντικαταστάσεις οδηγούν σε πιο σημαντικές αλλαγές, από υδρόφοβα σε υδρόφιλα αμινοξέα με μικρότερο όγκο. Επιπλέον η Ile-Thr εξουδετερώνει ένα αλειφατικό αμινοξύ, ενώ η Met-Thr οδηγεί σε απώλεια ενός ατόμου θείου. Στη μελέτη Sorani διαπιστώθηκε επίσης, ότι οι προαναφερθέντες SNPs παρουσίαζαν μικρότερη σχετική διαπερατότητα σε νερό (στατιστικώς σημαντική διαφορά,  $p < 0.001$ ) σε σχέση με την AQP4 αναφοράς, με τον I205L πολυμορφισμό να προκαλεί τη μεγαλύτερη μείωση [45]. Η μείωση της διαπερατότητας σε ύδωρ κυμαίνονταν σε ποσοστά μεταξύ 26 και 48% ( $p < 0.001$ ) σε σχέση με τον πόρο αναφοράς. Από την άλλη μεριά, ο αναφερόμενος M278T πολυμορφισμός φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη σχετική διαπερατότητα σε ύδωρ, δηλαδή σχετίζεται με «κέρδος λειτουργικότητας» (να σημειωθεί ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν ανιχνεύθηκε στη μελέτη Sorani). Ανιχνεύθηκαν, συνεπώς, τέσσερις SNPs με μειωμένη λειτουργικότητα, ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο οι τέσσερις SNPs προκαλούν μείωση της διαπερατότητας της AQP4 σε ύδωρ δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Να αναφέρουμε ακόμη ότι η συχνότητα των τεσσάρων nsSNPs ήταν χαμηλή (1-2% συχνότητα αλληλομόρφων συνολικά), υποδηλώνοντας ενδεχομένως επιβλαβείς συνέπειες, καθώς και ότι ενώ καμία από τις πέντε παραλλαγές δεν φάνηκε να επηρεάζει άμεσα τη διαμόρφωση ή την εκλεκτικότητα του πόρου, όλες μείωναν τη σταθερότητα της πρωτεΐνης [45]. Υπάρχουν, επίσης, αναφορές που αναδεικνύουν την πιθανή επίδραση και μη κωδικοποιητικών πολυμορφισμών της AQP4 στην λειτουργία της [45].

Από κλινικής σκοπιάς, επιδημιολογικές μελέτες έχουν εντοπίσει διαφορές με βάση την εθνικότητα ως προς την έκβαση μετά από εγκεφαλικό τραυματισμό, οι οποίες θα μπορούσαν να σχετίζονται με διαφορές σε αλληλόμορφα ποικίλων γονιδίων. Στην περίπτωση μας, οι πολυμορφισμοί της AQP4 είναι

πιθανό να συσχετίζονται με κλινικούς φαινοτύπους: για παράδειγμα, έχουμε ήδη αναφέρει πως σε μοντέλα ποντικών με έλλειψη της AQP4, σε περιπτώσεις κυτταροτοξικού οιδήματος, παρατηρείται λιγότερο οίδημα των αστροκυττάρων και βελτιωμένη επιβίωση. Κατ'επέκταση, ένα ενδιαφέρον ερώτημα προς μελέτη είναι, αν η επίδραση συγκεκριμένων πολυμορφισμών της AQP4 σε ανθρώπους, θα μπορούσε να είναι παρόμοια προστατευτική. Η σημασία τέτοιων μελετών γίνεται ακόμη πιο μεγάλη αν αναλογιστεί κανείς, ότι κάθε χρόνο στις ΗΠΑ, για παράδειγμα, καταγράφονται περίπου 1.4 εκατομμύρια κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις και 750.000 εγκεφαλικά – χωρίς να συνυπολογίσουμε το οίδημα σε όγκους και άλλες διαταραχές της ισορροπίας ύδατος. Οι πέντε και μόνο προαναφερθέντες πολυμορφισμοί, θα μπορούσαν να επηρεάζουν την έκβαση σε πάνω από 100.000 ανθρώπους [45].





**Εικόνα 5 :** Α) Χαρακτηριστικά του γονιδίου της AQP4. Η μακρά ισομορφή αποτελείται από 5 εξόνια. Β) Σχηματική δευτεροταγής δομή της AQP4, με τις ενδοκυττάριες αμινο- , καρβοξυτελικές περιοχές, τις 6 διαμεμβρανικές περιοχές και τις 5 αγκύλες, καθώς και τους 4 νέους SNPs (τετραγωνάκια) και τον M278T (κύκλος). Figure generated by TOPO2 (<http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO-run/wtopo.pl>). Γ) και Δ) Τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή της AQP4 αρουραίου, με 93% ταύτιση με την ανθρώπινη, όπου παρουσιάζονται οι 4 νέοι πολυμορφισμοί (πράσινο, πορτοκαλί, κίτρινο, κίτρινο-πράσινο), όπως γίνονται ορατοί διαμέσω του διαύλου και σε πλάγια λήψη. Figures generated by UCSF Chimera (<http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO-run/wtopo.pl>). [45]



## AQP4 και εγκεφαλικό οίδημα

Ο ρόλος της AQP4 στην ισορροπία ύδατος στο ΚΝΣ είναι πλέον σήμερα καλά τεκμηριωμένος. Η AQP4 έχει μεγάλη λειτουργική σημασία στη διακίνηση ύδατος εντός και εκτός του εγκεφαλικού παρεγχύματος, μέσω ενίσχυσης της διαμεμβρανικής ροής του στα αστροκύτταρα [38]. Να υπενθυμίσουμε ότι τα αστροκύτταρα αποτελούν την κύρια δεξαμενή κυττάρων στον ανθρώπινο εγκέφαλο, σε αναλογία με τους νευρώνες τουλάχιστον 10:1 και η AQP4 αντιπροσωπεύει τον κύριο δίαυλο ύδατος τους. Το ρόλο «κλειδί» της AQP4 στο εγκεφαλικό οίδημα διαπιστώνουμε αρχικά από έμμεσα στοιχεία: η AQP4 παρουσιάζει μια «προς τα πάνω» ρύθμιση (upregulation) σε καταστάσεις που προκαλείται εγκεφαλικό οίδημα, όπως τα κακοήγη αστροκυττώματα [46,48], η οξεία βακτηριακή μηνιγγίτιδα [46] και η υπαραχνοειδής αιμορραγία [46,47]. Σε κάποιες περιπτώσεις, όπως στα αστροκυττώματα, ο βαθμός της «προς τα πάνω» ρύθμισης σχετίζεται με το μέγεθος του εγκεφαλικού οιδήματος [46,48]. Πολυμορφισμοί της AQP4 έχουν ανιχνευθεί σε ανθρώπους, σχετιζόμενοι με διαφορετικές ωσμωτικές διαπερατότητες μεμονωμένων διαύλων [45], με έναν συγκεκριμένο μάλιστα (rs9951307), να συσχετίζεται με την ανάπτυξη σοβαρού εγκεφαλικού οιδήματος μετά από απόφραξη της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας [64]. Συνυπολογίζοντας κανείς τα ανωτέρω στοιχεία, αντιλαμβάνεται το ρόλο της AQP4 στο εγκεφαλικό οίδημα, αν και δεν υποδηλώνεται το κατά πόσο η συμμετοχή της αφορά το σχηματισμό ή την εξουδετέρωσή του.

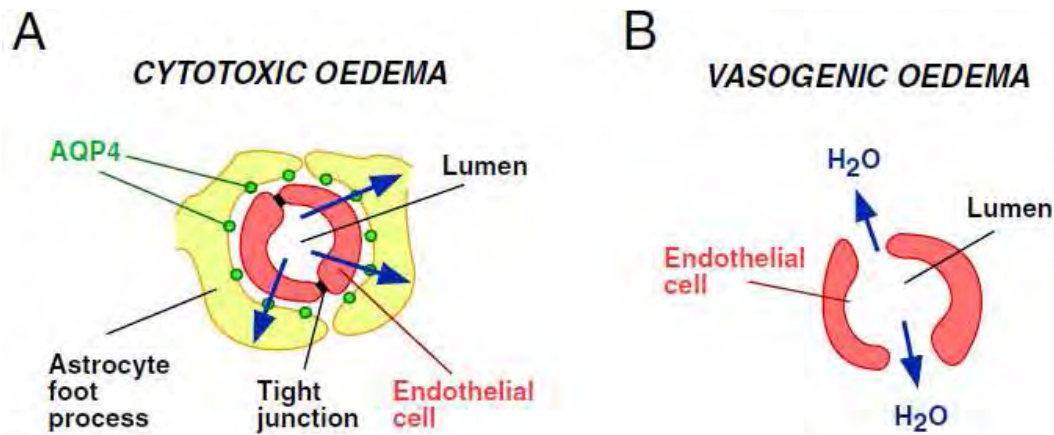
Οι πρώτες άμεσες αποδείξεις για τον βασικό ρόλο της AQP4 στην ανάπτυξη κυτταροτοξικού οιδήματος προέρχονται από μελέτες σε AQP4- null ποντίκια. Οι Manley et al., [49] ανέδειξαν μειωμένο εγκεφαλικό οίδημα και θνητότητα μετά από δηλητηρίαση εξ ύδατος σε ποντίκια με έλλειψη AQP4, συγκριτικά με ποντίκια αγρίου τύπου. Μειωμένο εγκεφαλικό οίδημα και βελτιωμένη έκβαση διαπιστώθηκε και 24 ώρες μετά από απόφραξη της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας σε αντίστοιχες ομάδες ποντικών [49]. Οι Solenov et al., κατέδειξαν ότι αστροκύτταρα που στερούνται AQP4 είχαν 7 φορές μειωμένη διαπερατότητα ύδατος σε σχέση με αντίστοιχα κύτταρα με φυσιολογική

έκφραση AQP4 [50]. Επιπλέον πειράματα αποκάλυψαν μικρότερο οίδημα και βελτιωμένη επιβίωση σε AQP4-null ποντίκια μετά από στρεπτοκοκκική μηνιγγίτιδα [51]. Σε αυτά τα πειραματικά μοντέλα η έλλειψη AQP4 περιορίζει το εγκεφαλικό οίδημα, μέσω μείωσης του σχηματισμού του [51]. Οι Ottersen και Amiry-Moghaddam παρατήρησαν λιγότερο εγκεφαλικό οίδημα μετά από δηλητηρίαση εξ ύδατος και απόφραξη της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας, σε ποντίκια στα οποία είχε εξαλειφθεί το γονίδιο της α- συντροφίνης [52,53]. Η έλλειψη της α-συντροφίνης διαταράσσει την έκφραση της AQP4 στα τελικά αγγειακά πόδια των αστροκυττάρων, οπότε τα ποντίκια στα οποία είχε εξαλειφθεί το γονίδιο της α- συντροφίνης συμπεριφέρονταν λειτουργικά, ως ποντίκια στα οποία είχε εξαλειφθεί το γονίδιο της AQP4. Όλα τα παραπάνω στοιχεία παρέχουν σαφείς, άμεσες ενδείξεις για τη συμμετοχή της AQP4 στο κυτταροτοξικό οίδημα, δημιουργώντας προβληματισμούς για την πιθανή χρήση εκλεκτικών της AQP4 αναστολέων στη μείωση της συσσώρευσης ύδατος στο κυτταροτοξικό οίδημα [22].

Το αγγειοκινητικό εγκεφαλικό οίδημα δημιουργείται λόγω διάσπασης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και διαρροής ενδοαγγειακού υγρού στον εξωκυττάριο χώρο, ανεξάρτητα από τη συμμετοχή της AQP4. Η διαπίστωση σε διάφορα πειραματικά μοντέλα ότι η έλλειψη AQP4 αυξάνει το αγγειοκινητικό εγκεφαλικό οίδημα υποδηλώνει ότι η απορρόφηση του οιδήματος ακολουθεί διακυττάρια, εξαρτώμενα από την AQP4, μονοπάτια. Οι τρεις πιθανοί οδοί εξουδετέρωσης του οιδήματος, δηλαδή η αφοριστική γλοία, το επένδυμα και ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός, είναι πλούσια σε AQP4 [25], είναι δε καλά τεκμηριωμένη η μειωμένη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού σε έλλειψη AQP4 [49,51-54]. Πειραματική φλοιϊκή βλάβη οδήγησε σε εκτεταμένη διαταραχή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού σε ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί το γονίδιο AQP4, καθώς και σε αγρίου τύπου ποντίκια, αλλά τα πρώτα, παρουσίαζαν σημαντικά μεγαλύτερο οίδημα και υψηλότερη ενδοκράνια πίεση [55]. Επίσης, συγκρίνοντας το αγγειοκινητικό οίδημα που δημιουργείται γύρω από όγκο (μετά από εμφύτευση κυττάρων μελανώματος στο ραβδωτό σώμα) σε ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί το γονίδιο AQP4 και σε αγρίου τύπου ποντίκια,

παρατηρείται υψηλότερη ενδοκράνια πίεση και επιταχυνόμενη νευρολογική επιδείνωση στα πρώτα [55]. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και σε σταφυλοκοκκικά εγκεφαλικά αποστήματα, όπου εκτός από το αυξημένο περιαποστηματικό οίδημα και την αυξημένη ενδοκράνια πίεση στα ποντίκια με έλλειψη AQP4, παρατηρήθηκε και μεγαλύτερη θνησιμότητα [56]. Σε όλα τα προαναφερθέντα πειραματικά μοντέλα το μέγεθος των βλαβών και ο βαθμός διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ήταν παρόμοια, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι δυνάμεις που οδήγησαν στην ανάπτυξη αγγειοκινητικού οιδήματος ήταν ανάλογες στις δύο ομάδες ποντικών και οι διαφορές οφείλονταν στην επηρεασμένη κάθαρση ύδατος από τον εξωκυττάριο χώρο στα AQP4-null ποντίκια [33]. Από κλινικής άποψης οι φαινοτυπικές μελέτες σε AQP4-null ποντίκια δείχνουν ότι η έλλειψη AQP4 μειώνει την κάθαρση του εξωκυττάριου υγρού και επιδεινώνει την έκβαση σε μοντέλα όπου το αγγειοκινητικό οίδημα είναι ο κυρίαρχος παθοφυσιολογικός μηχανισμός. Κατ'επέκταση, η χρήση αναστολέων της AQP4 δεν θα είχε θέση στη θεραπεία του αγγειογενούς εγκεφαλικού οιδήματος [33].

Συνοψίζοντας, διαπιστώνεται μέσω πολλών πειραματικών μοντέλων ο πολύπλοκος, διπλός, ρυθμιστικός ρόλος της AQP4 στη δημιουργία και απορρόφηση του εγκεφαλικού οιδήματος, με την αυξημένη έκφραση/λειτουργικότητα της AQP4 να επιταχύνει την εξουδετέρωση του αγγειοκινητικού εγκεφαλικού οιδήματος και τη μειωμένη έκφραση / λειτουργικότητα της AQP4 να επιβραδύνει τη δημιουργία κυττοτοξικού εγκεφαλικού οιδήματος [55]. (εικ.6)



**εικόνα 6:** Προτεινόμενοι μηχανισμοί της συμμετοχής της AQP4 στη δημιουργία οιδήματος: Α) Στο κυτταροτοξικό οίδημα, η είσοδος του πλεονάζοντος υγρού στο εγκεφαλικό παρέγχυμα είναι εξαρτώμενη από την AQP4, γιατί το οιδηματικό υγρό ρέει από το αγγειακό διαμέρισμα μέσω του ανέπαφου αιματοεγκεφαλικού φραγμού (ΕΑΦ) και των πλούσιων σε AQP4 τελικών αποφύσεων των αστροκυττάρων και συσσωρεύεται κατεχοχόν στα αστροκυττάρω. Β) Στο αγγειογενές οίδημα, η συσσώρευση ύδατος είναι ανεξάρτητη από την AQP4 γιατί ο ΕΑΦ έχει διαρραγεί, επιτρέποντας την είσοδο υγρού απευθείας στο εγκεφαλικό εξωκυττάρω χώρο, παρακάμπτοντας τις τελικές αποφύσεις των αστροκυττάρων [25].

## AQP4 και ισχαιμική - τραυματική εγκεφαλική βλάβη

Η οξεία εστιακή βλάβη του εγκεφάλου, όπου περιλαμβάνεται η κάκωση, η ισχαιμία και η υπαραχνοειδής αιμορραγία, προκαλεί μεταβολές στην έκφραση της AQP4 [55]. Για χρόνια θεωρούνταν πως το αγγειοκινητικό οίδημα ήταν ο κυρίαρχος τύπος οιδήματος μετά από τραυματική εγκεφαλική βλάβη. Η ανάπτυξη μηχανικών μοντέλων τραυματικής εγκεφαλικής βλάβης και η χρήση απεικόνισης με μαγνητικό συντονισμό, αποκάλυψαν ότι και το κυτταροτοξικό οίδημα έχει καθοριστική παθοφυσιολογική σημασία, καθώς αναπτύσσεται νωρίς και επιμένει ενώ η ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού σταδιακά αποκαθίσταται [22]. Εικοσιτέσσερις ώρες μετά από τραυματική εγκεφαλική βλάβη, βρέθηκε μια «προς τα κάτω» ρύθμιση της έκφρασης της

AQP4 στον τραυματισμένο φλοιό- ιδιαιτέρως σε περιοχές που επηρεάζονται από τη διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, οπότε το κυρίαρχο οίδημα είναι το αγγειοκινητικό - χωρίς σημαντική αλλαγή στο επίπεδο έκφρασης της AQP4 στα πιο απομακρυσμένα σύστοιχα βασικά γάγγλια και τον αντίπλευρο φλοιό [57]. Μια σταδιακή μείωση της AQP4 στο τραυματισμένο ημισφαίριο παρατηρείται με την πάροδο του χρόνου, με σημαντική μείωση να καταγράφεται 48 ώρες μετά τον τραυματισμό, ενώ μια αύξηση παρατηρείται στα όρια της τραυματικής βλάβης, σε περιοχές όπου διατηρήθηκε ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός, οπότε το κυρίαρχο οίδημα ήταν το κυτταροτοξικό, 3 μέρες μετά τον τραυματισμό [57]. Τα παρατηρούμενα αντίθετα αποτελέσματα που περιγράφονται, μπορεί να οφείλονται κατά ένα μέρος στο παροδικό αγγειοκινητικό οίδημα και κατά ένα άλλο στο παρατεταμένο κυτταροτοξικό οίδημα: η μείωση της AQP4 μετά από τραυματισμό μπορεί να σχετίζεται με πιθανή προστατευτική δράση έναντι του σχηματισμού αγγειοκινητικού οιδήματος [57], ενώ η αύξηση μπορεί να είναι σημαντική στην απορρόφηση του κυτταροτοξικού οιδήματος [57,58]. Ωστόσο, έρευνες πάνω σε τοπικές αλλαγές στην AQP4 μετά από τραυματισμό του εγκεφάλου, δεν παρείχαν σταθερή εικόνα ως προς τις χρονοεξαρτώμενες αλλαγές της έκφρασης της AQP4: οι Sun et al., κατέδειξαν μια «προς τα πάνω» ρύθμιση της AQP4 στην περιοχή της κάκωσης και μια «προς τα κάτω ρύθμιση» γειτονικά της [59]. Σε αντίθεση, οι Zhao et al., 2005 έδειξαν μειωμένα επίπεδα AQP4 στον πυρήνα του τραύματος και μέτρια αύξηση της στην ισχαιμική περιοχή που τον περιβάλλει [60]. Χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο αρουραίων με διατιτραίνοντα εγκεφαλικό τραυματισμό (penetrating brain injury) (PBI), οι Neal et al βρήκαν ότι η ανοσοδραστικότητα της AQP4 ήταν σημαντικά αυξημένη στην περιτραυματική περιοχή και στις 24 και στις 72 ώρες μετά τον τραυματισμό [61].

Η χρονική εξέλιξη της έκφρασης της AQP4 διαφέρει μεταξύ αγγειακού εγκεφαλικού και άλλων μοντέλων τραυματικής εγκεφαλικής βλάβης [63]. Σε αντίθεση με την κάκωση, η έκφραση της AQP4 παρουσιάζει ταχύτατα μια «προς τα πάνω» ρύθμιση στα τελικά πόδια των αστροκυττάρων σε επαφή με τα αιμοφόρα αγγεία, που φτάνει στην αιχμή της 1 ώρα μετά το εγκεφαλικό σε

μοντέλα με παροδική απόφραξη της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας - η αύξηση δε αυτή παρατηρείται στην περιοχή της μελλοντικής βλάβης [62,63]. Η αύξηση της έκφρασης της AQP4 σχετίζεται προσωρινά με το βαθμό του εγκεφαλικού οιδήματος [62,63] και συνακόλουθα, η πρώιμη χορήγηση φαρμάκων που θα ανέστελλαν την έκφραση/λειτουργικότητά της, θα μπορούσε να είναι χρήσιμη κλινικά. Η πρώιμη αύξηση της έκφρασης της AQP4 δεν παρατηρείται σε μοντέλα με σοβαρότερο αγγειακό εγκεφαλικό, όπως σε μόνιμη απόφραξη του άνω κλάδου της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας, δημιουργώντας την υπόθεση ότι σε μεγαλύτερη ιστική βλάβη ο εγκέφαλος πιθανώς δεν μπορεί να συνθέσει επαρκείς νέες AQP4. Μετά από επαναιμάτωση η αναλογία AQP-M1 και AQP-M23 αλλάζει στο ισχαιμικό ημισφαίριο, με μεγαλύτερη επαγωγή της AQP-M1 σε σχέση με τη M23 (όπως διαπιστώνεται με Western blot), δηλώνοντας αποδιοργάνωση των OAPs [62]. Σε μοντέλο παροδικής απόφραξης της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας, μια δεύτερη αιχμή της έκφρασης της AQP4 παρατηρείται στην ισχαιμική περιοχή (penumbra) 48 ώρες μετά, που συσχετίζεται με το εγκεφαλικό οίδημα και συνδέεται με επαγωγή της AQP4 στις τελικές αποφύσεις των αστροκυττάρων και τα κυτταρικά σώματα [63]. Σε ήπιο αγγειακό εγκεφαλικό η αυξημένη έκφραση της AQP4 δεν διαπιστώθηκε μετά την 7<sup>η</sup> ημέρα [63], αλλά σε πιο βαριές βλάβες η αύξηση παρέμεινε μέχρι και μετά από 28 ημέρες στο περιθώριο της υπολειμματικής τραυματικής περιοχής και συσχετιζόταν με τη διάλυση του οιδήματος.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## Σκοπός της μελέτης

Η έκβαση μετά από μια κρανιοεγκεφαλική κάκωση παρουσιάζει σημαντική ποικιλομορφία. Με δεδομένη τη συμμετοχή διαφόρων γενετικών παραγόντων στην παθοφυσιολογία της ΚΕΚ, φαίνεται πως η έκταση της βλάβης του εγκεφάλου μετά από ΚΕΚ, θα μπορούσε να επηρεάζεται σε κάποιο βαθμό από γενετικούς πολυμορφισμούς. Έχοντας ήδη αναλύσει το ρόλο στην ανάπτυξη/απορρόφηση του εγκεφαλικού οιδήματος της AQP4, καθώς και της σημασίας του εγκεφαλικού οιδήματος στις ΚΕΚ, στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση συγκεκριμένων tag πολυμορφισμών (SNPs) της AQP4 σε διάφορες κλινικές παραμέτρους ασθενών μετά από ΚΕΚ (βαρύτητα κατά την εισαγωγή, εξάμηνη έκβαση).

## Ασθενείς και μέθοδος

Κατά τη μελέτη συλλέχθηκαν 363 ασθενείς οι οποίοι διεκομίσθησαν στο τμήμα επειγόντων περιστατικών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Η καταγραφή των ασθενών περιελάμβανε:

- 1) τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών (φύλο, ηλικία),
- 2) τη νευρολογική σημειολογία και εκτίμηση της αρχικής κλινικής εικόνας των ασθενών, με τη χρήση της κλινικής κλίμακας κώματος της Γλασκώβης ( Glasgow Coma Scale , GCS). Η GCS λαμβάνει τιμές από 3 (βαθύ κώμα) έως 15 (χωρίς διαταραχή του επιπέδου συνείδησης). Για καλύτερη ανάλυση των αποτελεσμάτων δημιουργήθηκαν τρεις υποκατηγορίες ασθενών ανάλογα με τις τιμές της GCS: 3-8, 9-12, 13-15, αντιπροσωπεύοντας βαριά, μέτρια και ελαφρά κλινική εικόνα, αντίστοιχα,
- 3) αιμοληψία και απομόνωση γενωμικού DNA από πυρήνες λευκοκυττάρων (με τη μέθοδο της εξαλάτωσης και προσθήκη πρωτεΐνάσης K) και ακολούθως, έλεγχο της ποιότητας και της ποσότητας του DNA με φωτομέτρηση και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης,



- 4) επανεκτίμηση των ασθενών 6 μήνες μετά την ΚΕΚ και καταγραφή της έκβασης και της λειτουργικής αποκατάστασής τους με την κλίμακα έκβασης της Γλασκώβης ( Glasgow Outcome Scale, GOS). Για καλύτερη στατιστική ανάλυση δημιουργήθηκαν δύο κατηγορίες ασθενών: ευνοϊκής έκβασης (favorable outcome), στην οποία ανήκαν ασθενείς που ήταν λειτουργικά ανεξάρτητοι μετά το συμβάν (GOS= ασθενείς με πλήρη ανάρρωση (G) ή μέτρια ανικανότητα (MD)) και μη ευνοϊκής έκβασης (unfavorable outcome, GOS= ασθενείς με σοβαρή ανικανότητα (SD) ή σε φυτική κατάσταση (V) ή ασθενείς που κατέληξαν (D)).

## Τεχνικό μέρος

Ακολούθως περιγράφονται συνοπτικά οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν για την απομόνωση των πολυμορφισμών της AQP4 που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας.

Η απομόνωση γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της εξαλάτωσης, από εμπύρνηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (πυρήνες λευκοκυττάρων). Η διαδικασία ξεκινά με τη λήψη 10ml αίματος που τοποθετούνται σε σωληνάριο, παρουσία αντιπηκτικού  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ . Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του γενωμικού DNA είναι τα ακόλουθα:

– Διαλύματα διάσπασης των πυρήνων

Lysis I:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (155mM),  $\text{KHCO}_3$  (10mM), EDTA (1mM), pH=7.4

Lysis II: Tris (10mM), NaCl (400mM), di-Na EDTA (2mM), pH=8.2

– Διάλυμα πρωτεϊνάσης K (10mg/ml)

– Διάλυμα 10% w/v SDS (sodium dodecyl sulfate: δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο)

– Κορεσμένο διάλυμα NaCl (6M)

– Απόλυτη αιθανόλη

–  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (3M)

– Πηκτική αγαρόζης 1%

Το DNA που συλλέγεται, ακολουθώντας συγκεκριμένη αλληλουχία σταδίων, φυλάσσεται στους 4°C (για συχνή χρήση) ή στους -20°C (για μεγάλο χρονικό διάστημα).

Στη συνέχεια προσδιορίζεται η ποιότητα του DNA που απομονώθηκε καθώς και η συγκέντρωσή του. Ο έλεγχος της ποιότητας πραγματοποιείται με **ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης** (1%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και το DNA γίνεται ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία σε συσκευή UV. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής του DNA (ποσοτικά) περιλαμβάνει την τεχνική της **φωτομέτρησης** σε φασματοφωτόμετρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να απορροφά εκλεκτικά ακτινοβολία μήκους κύματος 260nm. Η μέθοδος αυτή είναι αρκετά ευαίσθητη και μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητες DNA μέχρι και 0,2μg DNA/ml διαλύματος. Να υπενθυμίσουμε ότι με τη μέθοδο αυτή μπορεί να εκτιμηθεί και η καθαρότητα του DNA που απομονώσαμε με βάση το λόγο  $OD_{260}/OD_{280}$ , όπου (OD) η οπτική πυκνότητα υδατικού διαλύματος DNA (αραιωμένο διάλυμα DNA 1:100) σε μήκος κύματος 260nm και 280 nm σε κυψελίδα χαλαζία με διαδρομή φωτός 1cm. Τιμές του λόγου μεταξύ 1,7 και 1,9 υποδηλώνουν παρουσία επαρκώς καθαρού DNA, τιμές μικρότερες του 1,7 φανερώνουν ότι το διάλυμα του DNA περιέχει πρωτεΐνες, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 1,9 υποδηλώνουν πρόσμιξη με RNA.

Με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (**PCR**) επιτυγχάνεται ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός επιλεγμένων αλληλουχιών DNA (DNA-στόχου) από ελάχιστη αρχική ποσότητα δείγματος, προκειμένου να γίνει εφικτή στη συνέχεια η ανάλυση πολυμορφισμών. Συνοπτικά αναφέρουμε ότι η τεχνική της PCR αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους. Κάθε κύκλος της PCR περιλαμβάνει τρία στάδια και η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται εξ'ολοκλήρου *in vitro* σε ένα σωληνάριο τύπου erpendorf με τη χρήση θερμικού κυκλοποιητή:

1<sup>ο</sup> στάδιο: θερμική αποδιάταξη του DNA-εκμαγείου, όπου το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο (denaturation)

2<sup>ο</sup> στάδιο: σύνδεση εκκινητών, όπου οι δύο εκκινητές υβριδίζονται με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου (primer annealing)

3<sup>ο</sup> στάδιο: σύνθεση DNA, όπου παρουσία Taq DNA πολυμεράσης και dNTPs, οι συμπληρωματικές βάσεις προστίθενται στα 3' άκρα των εκκινητών με βάση την αλυσίδα DNA-εκμαγείο και οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες επεκτείνονται (extension). Η σύνθεση DNA γίνεται πάντοτε προς την κατεύθυνση 5' → 3'.

Για τα παραπάνω στάδια απαραίτητη είναι μια επαναλαμβανόμενη εναλλαγή ανάμεσα σε μια υψηλή θερμοκρασία για το διαχωρισμό των αλυσίδων του DNA, μια σχετικά χαμηλή θερμοκρασία για τον υβριδισμό των εκκινητών με συμπληρωματικές περιοχές του DNA-στόχου και μια ενδιάμεση θερμοκρασία για την επέκταση των εκκινητών. Οι κύκλοι αυτοί αποδιάταξης και σύνθεσης νέου DNA μπορεί να επαναληφθούν πολλές φορές, συνήθως 30 ή 40, καταλήγοντας στο σχηματισμό περισσότερων από 1 δισεκατομμύριο πιστών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA.

Η ανίχνευση πολυμορφισμών στο τμήμα DNA που έχει ενισχυθεί (PCR product), μπορεί να γίνει με τη χρήση ενζύμων περιορισμού. Τα ένζυμα περιορισμού είναι ενδονουκλεάσες που κόβουν, κατά τρόπο επαναλαμβανόμενο και καθορισμένο, το δίκλωνο μόριο DNA, με παραγωγή δύο σημείων κοπής (ένα μέσω κάθε μιας από τις αλυσίδες της διπλής έλικας). Υπάρχουν δυο κύριες ομάδες ενζύμων περιορισμού: η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα ένζυμα που δημιουργούν κολλώδη μονόκλωνα άκρα (sticky ends) και η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει ένζυμα που δημιουργούν μη κολλώδη δίκλωνα άκρα (blunt ends) – κοινή ιδιότητα όλων είναι ότι αναγνωρίζουν μια εξειδικευμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων στο DNA. Ανάλογα δε με τη δράση τους μετά την αναγνώριση της ειδικής αλληλουχίας, διακρίνουμε τρεις τύπους περιοριστικών ενζύμων (I, II, III) – στο εργαστήριο χρησιμοποιούνται τα τύπου II ένζυμα (αναγνωρίζουν την αλληλουχία και τέμνουν το DNA στο επίπεδό της).

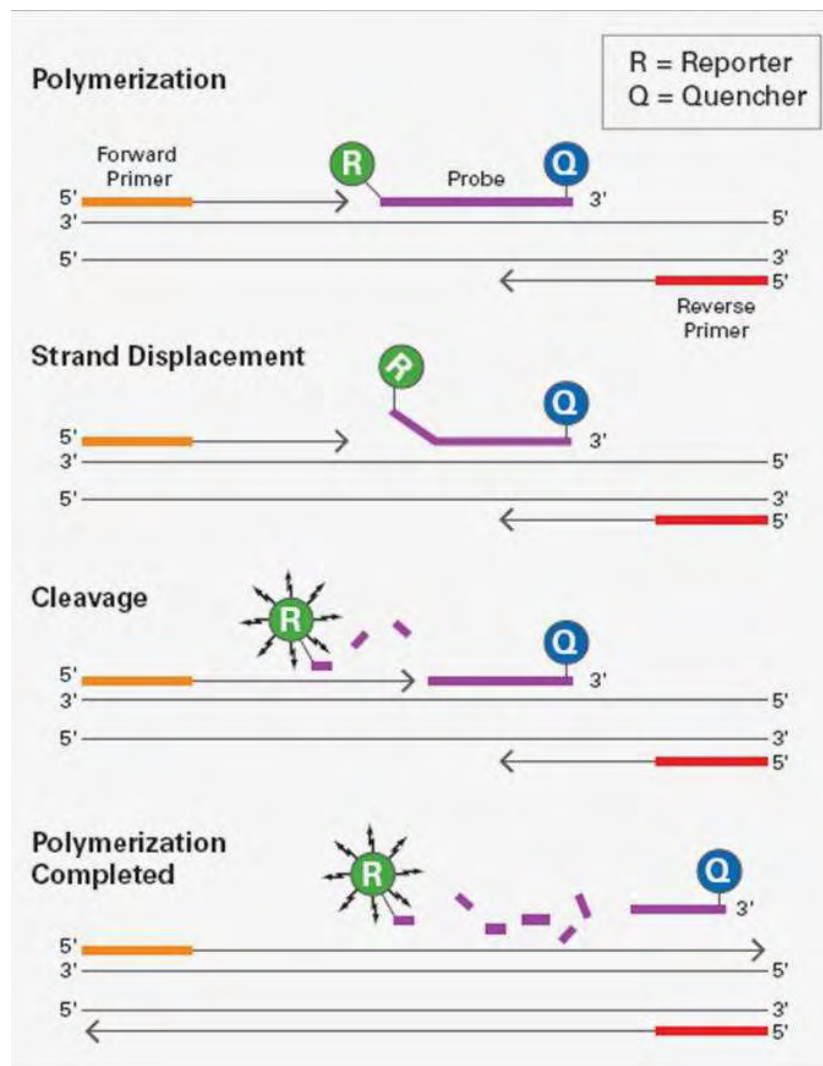
Η μέθοδος της **Real-Time PCR** αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής μεθόδου, η οποία μπορεί να ενισχύσει, να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει μια αλληλουχία-στόχο με μεγαλύτερη ταχύτητα και αποτελεσματικότητα.

Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου αποτέλεσε η δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης σε οποιοδήποτε στάδιο βρίσκεται η αντίδραση, επιτρέποντας ουσιαστικά τη μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος που παράγεται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του προϊόντος που συντίθεται και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Ο φθορισμός μετريέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που μας επιτρέπει να παρακολουθούμε όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Συνοπτικά αναφέρουμε ότι η καμπύλη ενίσχυσης περιλαμβάνει τρεις φάσεις: την εκθετική, όπου σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, τη γραμμική όπου λόγω έναρξης εξάντλησης αντιδραστηρίων και συσσώρευσης αναστολέων, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται και τη φάση κορεσμού όπου η αντίδραση ενίσχυσης σταματά εντελώς. Για την ποσοτικοποίηση εκτιμάται η εκθετική φάση με βάση την τιμή Ct (threshold cycle, δηλαδή τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold)), με τον κανόνα ότι όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος.

Η γονοτύπωση των tag SNPs που μελετήσαμε στους ασθενείς με ΚΕΚ βασίστηκε στη **μέθοδο Taqman** και πραγματοποιήθηκε με Taqman ειδικές δοκιμασίες διάκρισης αλληλομόρφων, σε σύστημα ανίχνευσης αλληλουχιών ABI PRISM® 7900. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SDS (Applied Biosystems, Foster City, USA) για τη αναγνώριση των παρατηρούμενων φθορισμών και αντιστοίχισή τους με τους γονότυπους.

Η μέθοδος Taqman είναι μια ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR) που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό πολυμορφισμών σε συγκεκριμένο τμήμα του DNA. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δράση 5'-νουκλεάσης της DNA πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιείται για την υδρόλυση του ανιχνευτή. Αναλυτικότερα, ο Taqman ανιχνευτής είναι ένα ολιγονουκλεοτίδιο που φέρει στο 5' άκρο του μια

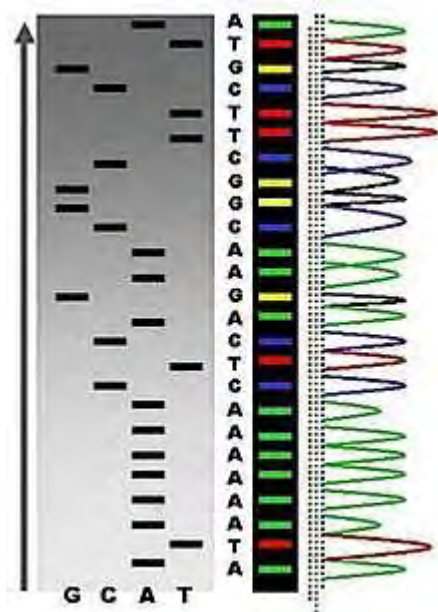
χρωστική που φθορίζει (reporter dye) και στο 3' άκρο του μια άλλη χρωστική η οποία απορροφά και εξουδετερώνει το σήμα που προέρχεται από την πρώτη (quencher dye) όταν είναι σε εγγύτητα. Κατά συνέπεια, όταν ο ανιχνευτής είναι ανέπαφος δεν παρατηρείται φθορισμός. Η μέθοδος Taqman περιλαμβάνει επίσης τους παράγοντες της κλασικής PCR (εκκινητές, τριφωσφωρικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ιόντα μαγνησίου, Taq πολυμεράση) ενώ η PCR αντίδραση περιλαμβάνει τα γνωστά στάδια όπως αναφέρθηκαν παραπάνω δηλαδή της αποδιάταξης, της σύνδεσης και της επιμήκυνσης των εκκινητών. Κατά τη διάρκεια της PCR, ο ανιχνευτής υβριδίζει το τμήμα του DNA που περιέχει τον πολυμορφισμό που μας ενδιαφέρει. Έπειτα κατά τη διάρκεια της επέκτασης (extention) του τμήματος του DNA με τους κατάλληλους εκκινητές, ο ανιχνευτής υδρολύεται από την Taq πολυμεράση, με αποτέλεσμα την αποκοπή του άκρου του ανιχνευτή και κατ' επέκταση τη διακοπή της αλληλεξουδετέρωσης του σήματος και την παραγωγή φθορισμού. Καθώς ο πολυμερισμός συνεχίζεται αυξάνονται τα φθορίζοντα άκρα του ανιχνευτή που απελευθερώνονται και, συνεπώς, αυξάνεται παράλληλα η ένταση του φθορισμού. Η αύξηση αυτή είναι ανάλογη με το προϊόν του DNA που παράγεται. Να σημειώσουμε ότι η αύξηση του φθορισμού εμφανίζεται μόνο όταν η αλληλουχία-στόχος είναι συμπληρωματική του ανιχνευτή και ενισχύεται κατά τη διάρκεια της PCR – γι' αυτό δεν ανιχνεύεται μη ειδική ενίσχυση. Συγκρίνοντας τα σήματα καθορίζουμε την περιεκτικότητα κάθε δείγματος σε κάθε αλληλόμορφο. (εικόνα 7)




**εικόνα 7:** Αρχή της μεθόδου Taqman: Διακρίνονται οι δύο εκκινητές καθώς και ο ειδικός ανιχνευτής, ο οποίος προσδένεται σε εσωτερική αλληλουχία του προϊόντος. Η δράση 5'-νουκλεάσης της DNA πολυμεράσης, συμβάλλει στην υδρόλυση του ανιχνευτή, και κατ' επέκταση στην απελευθέρωση της φθορίζουσας χρωστικής που βρίσκεται στο 5' άκρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού, ο οποίος αυξάνεται ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος κατά την αντίδραση ενίσχυσης.

Για την επιβεβαίωση του παραπάνω αποτελέσματος της γονοτύπισης με την τεχνική Taqman πραγματοποιήθηκε επίσης και **DNA sequencing** σε συνολικά 50 από τους ασθενείς με ΚΕΚ. Η μέθοδος περιλαμβάνει διάφορες τεχνικές και τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της σειράς των νουκλεοτιδίων (αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη, κυτοσίνη) σε ένα μόριο DNA. Η

γενική αρχή της μεθόδου είναι η εισαγωγή ειδικά σημασμένων νουκλεοτίδιων (τριφωσφορικών διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs)) τα οποία τερματίζουν την ενίσχυση του DNA σε διάφορα σημεία με αποτέλεσμα την εμφάνιση της αλληλουχίας μετά από ηλεκτροφόρηση. Η κλασική μέθοδος τερματισμού περιλαμβάνει ένα μονόκλωνο DNA-πρότυπο, ένα DNA εκκινητή, μια DNA πολυμεράση, κανονικά τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) και τροποποιημένα νουκλεοτίδια (τα οποία στερούνται 3'-OH ομάδας, απαραίτητης για το σχηματισμό φωσφωδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο νουκλεοτιδίων) (dideoxynTPs) και τα οποία είναι σημασμένα (ραδιενεργώς ή με φθορίζουσες χρωστικές). Το δείγμα του DNA χωρίζεται σε τέσσερις sequencing αντιδράσεις, όπου περιέχονται και τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dCTP and dTTP) και DNA πολυμεράση. Σε κάθε αντίδραση προστίθεται ένα μόνο από τα τέσσερα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddATP, ddGTP, ddCTP, or ddTTP), οπότε και τερματίζεται η επιμήκυνση της έλικας του DNA, οδηγώντας στη δημιουργία θραυσμάτων DNA ποικίλου μήκους. Τα νεοσυντεθιμένα και σημασμένα τμήματα DNA αποδιατάσσονται θερμικά και διαχωρίζονται αναλόγως μεγέθους με ηλεκτροφόρηση σε γέλη, με καθεμιά από τις τέσσερις αντιδράσεις να λαμβάνουν χώρα σε μία από τέσσερις ανεξάρτητες σειρές (σειρά A,T,C,G) – οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές με υπεριώδη ακτινοβολία ή αυτοραδιογραφία και η αλληλουχία του DNA διαβάζεται σε ακτινολογικό φιλμ ή εικόνα γέλης (gel image) – στο φιλμ η αλληλουχία του DNA διαβάζεται από κάτω προς τα πάνω, με βάση τις σχετικές θέσεις των διαφόρων ζωνών ανάμεσα στις τέσσερις σειρές. Στις τεχνικές παραλλαγές της μεθόδου όπως αυτή που χρησιμοποιήσαμε στο εργαστήριο περιλαμβάνεται και η χρήση σημασμένου εκκινητή στο 5'- άκρο με φθορίζουσα χρωστική (dye- primer sequencing), και ανίχνευση της χρωστικής από τον αντίστοιχο laser αισθητήρα με ταχύτερα, πιο οικονομικά και αυτοματοποιημένα αποτελέσματα (εικόνα 7).

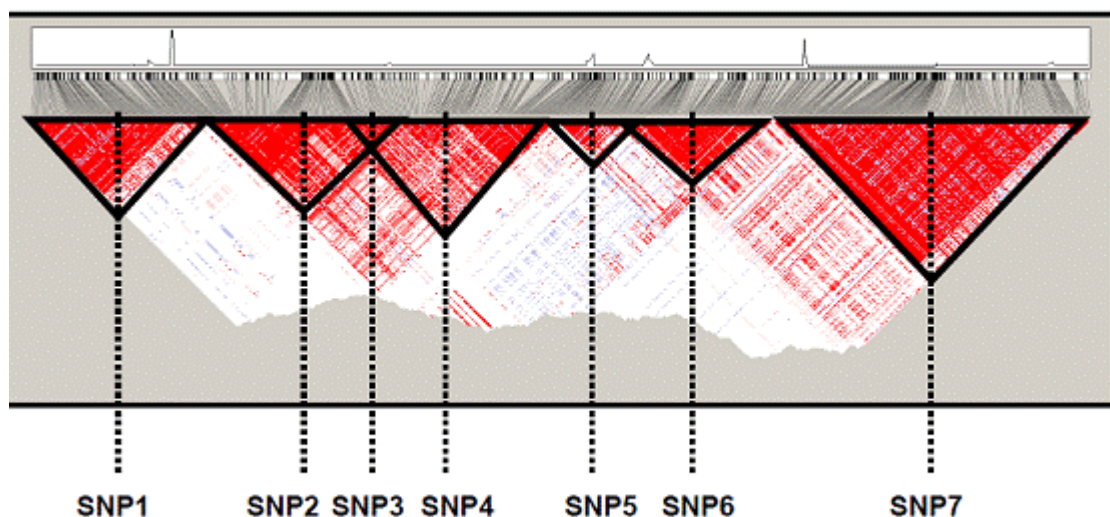


 **Εικόνα 7** : Απεικόνιση αποτελεσμάτων sequencing με χρήση ραδιογραφίας ( μαύρες ζώνες) και φθορίζοντων χρωστικών (χρωματιστές αιχμές)

Η όλη μελέτη μας στηρίχθηκε στη χρησιμοποίηση αντιπροσωπευτικών πολυμορφισμών στο γονίδιο της AQP4 ή αλλιώς όπως είναι γνωστοί στη βιβλιογραφία tag πολυμορφισμών (**tag– SNPs**). Για την επιλογή αυτών των αντιπροσωπευτικών πολυμορφισμών χρησιμοποιείται το μοντέλο της ανισορροπίας σύνδεσης (linkage disequilibrium (LD) που είναι παρούσα στους ανθρώπινους πληθυσμούς. Επιγραμματικά, ο όρος linkage disequilibrium (LD) περιγράφει την κατάσταση σύμφωνα με την οποία, στο ίδιο χρωμόσωμα, σε ένα γενετικό τόπο, ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο, κληρονομείται μαζί με κάποιο άλλο συγκεκριμένο αλληλόμορφο ενός δεύτερου γενετικού τόπου, συχνότερα από ότι θα συνέβαινε τυχαία. Με άλλα λόγια, πρόκειται για το φαινόμενο της εμφάνισης κάποιων συνδυασμών αλληλομόρφων ή γενετικών δεικτών σε ένα πληθυσμό, συχνότερα ή σπανιότερα από ότι θα περίμενε κανείς με βάση ένα τυχαίο σχηματισμό απλοτύπων από αλληλόμορφα, βάση των συχνοτήτων τους. Το μέγεθος της ανισορροπίας σύνδεσης εξαρτάται από τη διαφορά μεταξύ παρατηρούμενων και αναμενόμενων συχνοτήτων αλληλομόρφων. Συχνά εκφράζεται με το κεφαλαίο γράμμα D και στη βιβλιογραφία, όταν αναφέρεται πως δυο αλληλόμορφα είναι σε LD, σημαίνει



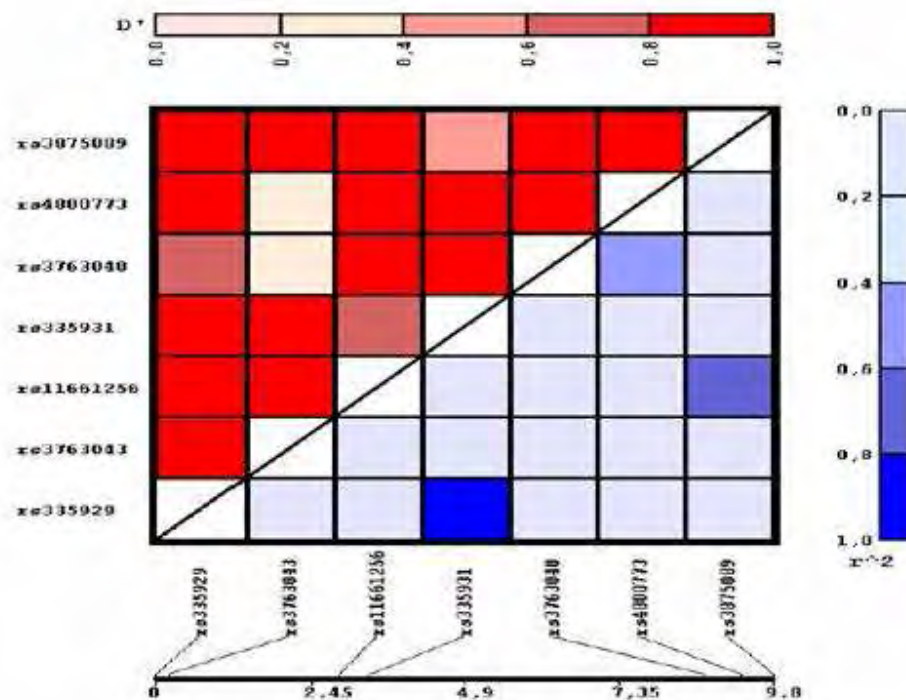
ότι το  $D \neq 0$ . Η ανισορροπία σύνδεσης μας επιτρέπει να επιλέξουμε tag-SNPs, δηλαδή SNPs που αντιπροσωπεύουν πολύ αποτελεσματικά άλλους, σε μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος με υψηλή LD. Έτσι αντί να μελετήσουμε το σύνολο των πολυμορφισμών σε ένα γενετικό τόπο μελετούμε μόνο τους tag-πολυμορφισμούς που, λόγω της υψηλής LD, αντιπροσωπεύουν πλήρως την ποικιλομορφία κατά μήκος του γονιδίου (εικ.8). Αυτό είναι πολύ χρήσιμο στις μελέτες γενετικής συσχέτισης ολοκλήρου του γονιδιώματος (genome wide association studies, GWAS) όπου απαιτείται γονοτύπωση μεγάλου αριθμού πολυμορφισμών. Με την προσέγγιση όμως της ανίχνευσης των tag-SNPs μέσω του φαινομένου της ανισορροπίας σύνδεσης ο αριθμός των υπό εξέταση πολυμορφισμών δύναται να μειωθεί στους ~300,000.



**εικόνα 8:** Σχηματική απεικόνιση LD δομής και επιλογής tag πολυμορφισμών: η λευκή μπάρα παριστάνει ένα γονίδιο σε όλο το μήκος του. Οι σκούρες μικρές γραμμές είναι οι διάφοροι πολυμορφισμοί που έχουν περιγραφεί κατά μήκος του γονιδίου. Τα κόκκινα τρίγωνα μας δείχνουν ποιοι πολυμορφισμοί έχουν βρεθεί ότι βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης, δηλαδή κληρονομούνται μαζί. Για κάθε ένα τρίγωνο θα επιλεγεί προς μελέτη και ένας αντιπροσωπευτικός πολυμορφισμός (tag-SNP).

Στη μελέτη μας για την επιλογή των tag SNPs κατά μήκος ολόκληρου του γονιδίου της AQP4 (13.7kb, εκτεινόμενο στο χρωμόσωμα 18 από τις θέσεις 22686005 έως 22699714) χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από το HarMap project για τους ευρωπαϊκούς καυκάσιους πληθυσμούς (Release 27, Phase II+III, Feb09, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126). Η επιλογή των tag SNPs έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος tagger (<http://www.broadinstitute.org/mpg/tagger/>). Κριτήρια που εφαρμόστηκαν ήταν η προσέγγιση κατά ζεύγη, με όριο  $r^2$  της ανισορροπίας σύνδεσής  $\geq 0.8$  και συχνότητα υπολειπόμενου αλληλομόρφου  $> 0.05$  (εικ.9).

Με βάση τα παραπάνω κριτήρια αναγνωρίστηκαν συνολικά 7 tag SNPs: οι **rs335929**, **rs3763043**, **rs11661256**, **rs335931**, **rs3763040**, **rs4800773** και **rs3875089**.



**Εικόνα 9:** Απεικόνιση της κατανομής της ανισορροπίας σύνδεσης ( $D'$  και  $r^2$ ) στο δείγμα των ασθενών μας για τους πολυμορφισμούς της AQP4.

## Στατιστική ανάλυση

Καταρχήν στο δείγμα για τους ληφθέντες γονότυπους εξετάσθηκε με τη χρήση του Fisher exact test, αν πληρούνταν η ισορροπία Hardy-Weinberg (H-W). Να υπενθυμίσουμε ότι το θεώρημα των Hardy-Weinberg χρησιμοποιείται για να περιγράψει γονιδιακές συχνότητες σε στατικούς από πλευράς εξέλιξης πληθυσμούς. Τέτοιοι πληθυσμοί ονομάζονται "πληθυσμοί που βρίσκονται σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg". Σύμφωνα με το θεώρημα αυτό, οι συχνότητες των αλληλόμορφων σε ένα πληθυσμό παραμένουν σταθερές κατά τις διάφορες γενιές, αν δεν επιδράσουν άλλοι παράγοντες εκτός από την ανακατανομή των γονιδίων κατά τη διαδικασία της γαμετογένεσης. Για την περίπτωση χαρακτηριστικού που καθορίζεται από δύο αλληλόμορφα (A και a), το θεώρημα ορίζει ότι:  $p+q = 1$ , όπου p η συχνότητα του ενός αλληλόμορφου του γονιδίου (A) και q η συχνότητα του άλλου (a), και ότι  $p^2+2pq+q^2 = 1$ , όπου  $p^2$  η συχνότητα των AA ατόμων, 2pq η συχνότητα των Aa και aA ατόμων και  $q^2$  η συχνότητα των aa ατόμων. Το θεώρημα των Hardy-Weinberg επιτρέπει τον υπολογισμό της συχνότητας των αλληλόμορφων σε ένα πληθυσμό, αν γνωρίζουμε τη συχνότητα των γονοτύπων, και αντίστροφα.

Επιπλέον έγινε ανάλυση ισχύος της μελέτης μας με τη χρήση του προγράμματος CaTS power calculator for genetic studies (Center for Statistical Genetics, University of Michigan, Ann Arbor, (<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/cats>)). Με βάση τη μέθοδο εκτίμησης της μεγίστης πιθανοφάνειας, κατασκευάστηκαν απλότυποι από tag SNPs αλληλόμορφα, χρησιμοποιώντας τα προγράμματα SimHap και SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>). Με τη βοήθεια του προγράμματος JLIN έγινε υπολογισμός της ανισορροπίας σύνδεσης (κατά ζεύγη D' και  $r^2$ ) μεταξύ των πολυμορφισμών που μελετήθηκαν (<http://www.genepi.com.au/projects/jlin>).

Οι ασθενείς με βάση την κλίμακα GOS σε έξι μήνες από την εισαγωγή τους, ταξινομήθηκαν ανάλογα με τη λειτουργικότητα /αυτονομία τους, σε δύο κατηγορίες: ευνοϊκής έκβασης (ασθενείς με καλή ανάρρωση ή μέτρια

ανικανότητα) ή δυσμενούς έκβασης (ασθενείς με σοβαρή αναπηρία, φυτική κατάσταση ή θάνατο). Για την εκτίμηση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ μεμονωμένων tag SNPs ή απλοτύπων που προέκυψαν από το συνδυασμό των αλληλομόρφων των tag-SNPs και έκβασης των ασθενών, χρησιμοποιήθηκαν μονοπαραγοντικά (univariate) και πολυπαραγοντικά (multivariate) μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης. Έγινε σταθεροποίηση των μοντέλων για το φύλο, την ηλικία και την GCS εισόδου. Επίσης, υπολογίστηκαν οι λόγοι αναλογιών (odds ratios, ORs) και τα αντίστοιχα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95% confidence intervals, CIs) εφαρμόζοντας τα διάφορα μοντέλα κληρονόμησης (επικρατητικό: [AA] vs [Ab+bb], υπολειπόμενο: [AA+Ab] vs [bb]), καθώς και μοντέλο αντίθεσης αλληλομόρφων ([A] vs [b]). Εφαρμόστηκε επίσης, η διόρθωση Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις και ορίστηκε το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας στο 0.05, διαιρεμένο με τον αριθμό των μελετούμενων SNPs.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSSv.17.0 ( SPSS Inc., Chicago,IL).

## Αποτελέσματα

Τα κύρια κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών που εκτιμήθηκαν απεικονίζονται στον πίνακα 2. Συνολικά συλλέχθηκαν 363 ασθενείς, 292 άνδρες (80,4%) και 71 γυναίκες (19,6%). Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν  $42,67 \pm 21,80$  έτη. Η βαρύτητα της κάκωσης καταγράφηκε κατά την είσοδο των ασθενών με βάση την κλίμακα της Γλασκώβης (GCS). Με βάση τις υποκατηγορίες της GCS, 130 ασθενείς (35,8%) είχαν βαριά κλινική εικόνα ( $GCS \leq 8$ ), 54 ασθενείς (14,9%) είχαν GCS 9-12 και 179 ασθενείς (49,3%) είχαν καλή κλινική εικόνα κατά την είσοδο στο νοσοκομείο ( $GCS 13-15$ ). Επίσης, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την κλίμακα έκβασης της Γλασκώβης (GOS), ανάλογα με την κλινική τους εικόνα 6 μήνες μετά την ΚΕΚ. Έτσι, από το σύνολο των ασθενών, 284 ασθενείς (ποσοστό 78,24%)

είχαν ευνοϊκή έκβαση μετά την ΚΕΚ και 79 ασθενείς (ποσοστό 21,76%) είχαν δυσμενή έκβαση. Από την ομάδα δε των ασθενών με ευνοϊκή έκβαση, 78 (ποσοστό 27,5%) παρουσίαζαν βαριά κλινική εικόνα ( $GCS \leq 8$ ) κατά την εισαγωγή, 36 (ποσοστό 12,7%) μέτρια κλινική εικόνα ( $GCS 9-12$ ), ενώ 170 (ποσοστό 59,8%) είχαν καλή κλινική εικόνα κατά την είσοδο τους στο νοσοκομείο ( $GCS 13-15$ ). Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για την ομάδα των ασθενών με τη δυσμενή έκβαση ήταν 52 ασθενείς (ποσοστό 65,8%,  $GCS \leq 8$ ), 18 ασθενείς (ποσοστό 22,8%) και 9 ασθενείς (ποσοστό 11,4%,  $GCS 13-15$ ).

<b>Πίνακας 2:</b> Χαρακτηριστικά ασθενών, GCS κατά την εισαγωγή και GOS εξαμήνου			
	Συνολικό δείγμα TBI (n=363)	Ευνοϊκή έκβαση (n=284)	Δυσμενής έκβαση (n=79)
Φύλο			
Άνδρες	292 (80.4)	228 (80.3)	64 (81.0)
Γυναίκες	71 (19.6)	56 (19.7)	15 (19.0)
Ηλικία (έτη)			
M.O	42.67	39.20	55.19
SD	21.80	20.15	23.05
Εύρος	18-88	18-84	18-88
GCS εισαγωγής			
3-8	130 (35.8)	78 (27.5)	52 (65.8)
9-12	54 (14.9)	36 (12.7)	18 (22.8)
13-15	179 (49.3)	170 (59.8)	9 (11.4)

Για τη μελέτη μας επιλέχθηκαν, όπως έχουμε ήδη περιγράψει, οι ακόλουθοι πολυμορφισμοί του γονιδίου της AQP4: rs335929, rs11661256, rs335931, rs3763040, rs4800773, rs3875089, rs3763043. Στον πίνακα 3 παρουσιάζεται η θέση των πολυμορφισμών στο χρωμόσωμα και στο γονίδιο, η απόσταση τους από την αφετηρία του γονιδίου, η λειτουργία τους και η συχνότητα του υπολειπόμενου αλληλομόρφου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό με βάση τα

δεδομένα του HapMap (HapMap Data Rel 27, Phase II+III, Feb09, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126).

**Πίνακας 3:** Χαρακτηριστικά tag SNPs της AQP4.

rs αριθμός	Θέση στο χρωμόσωμα	Απόσταση από την αφετηρία του γονιδίου	Θέση στο γονίδιο	Λειτουργία	Υπολ/νο αλληλ/φο (συχνότητα)
1. rs335929	24435587	3585	3'UTR	Ρυθμιστική	C (16.4)
2. rs3763043	24435818	3816	3'UTR	Ρυθμιστική	T (35.8)
3. rs11661256	24438540	6538	Intron 4-5	No-coding	A (14.2)
4. rs335931	24439072	7070	Intron 4-5	No-coding	G (16.7)
5. rs3763040	24444374	12372	Intron 1-2	No-coding	A (24.1)
6. rs4800773	24444981	12979	Intron 1-2	No-coding	A (41.2)
7. rs3875089	24445433	13431	Intron 1-2	No-coding	C (15.0)

Στον πίνακα 4 καταγράφονται οι κατανομές των γονοτύπων και των αλληλομόρφων των εξετασθέντων πολυμορφισμών του γονιδίου της AQP4 στους ασθενείς με ΚΕΚ συνολικά, καθώς και στις υποκατηγορίες της ευνοϊκής ή δυσμενούς έκβασης.

**Πίνακας 4:** Συχνότητες αλληλομόρφων και γονοτύπων για τους SNPs στο δείγμα των ασθενών με ΚΕΚ και σε αυτό της ευνοϊκής ή δυσμενούς πρόγνωσης.

SNP	Γονότυποι/αλληλόμορφα	Ολικό TBI δείγμα, n (%)	Ευνοϊκή έκβαση, n (%)	Δυσμενής έκβαση, n (%)
<b>rs335929</b>				
Γονότυπος	A/A	205 (57.9)	152 (55.3)	53 (67.1)
	A/C	125 (35.3)	104 (37.8)	21 (26.6)
	C/C	24 (6.8)	19 (6.9)	5 (6.3)
Αλληλόμορφο	A	535 (75.6)	408 (74.2)	127 (80.4)
	C	173 (24.4)	142 (25.8)	31 (19.6)
<b>rs3763043</b>				
Γονότυπος	C/C	196 (55.2)	166 (60.1)	30 (38.0)
	C/T	131 (36.9)	94 (34.1)	37 (46.8)
	T/T	28 (7.9)	16 (5.8)	12 (15.2)
αλληλόμορφο	C	523 (73.7)	426 (77.2)	97 (61.4)
	T	187 (26.3)	126 (22.8)	61 (38.6)
<b>rs11661256</b>				
Γονότυπος	T/T	297 (84.4)	234 (84.8)	63 (82.9)
	T/A	51 (14.5)	38 (13.8)	13 (17.1)
	A/A	4 (1.1)	4 (1.4)	0 (0.00)
Αλληλόμορφο	T	645 (91.6)	506 (91.7)	139 (91.4)
	A	59 (8.4)	46 (8.3)	13 (8.6)
<b>rs335931</b>				
Γονότυπος	A/A	207 (59.1)	152 (56.1)	55 (69.6)
	A/G	123 (35.1)	102 (37.6)	21 (26.6)
	G/G	20 (5.7)	17 (6.3)	3 (3.8)
Αλληλόμορφο	A	537 (76.7)	406 (74.9)	131 (82.9)
	G	163 (23.3)	136 (25.1)	27 (17.1)
<b>rs3763040</b>				
Γονότυπος	G/G	219 (60.7)	170 (60.3)	49 (62.0)
	G/A	110 (30.5)	92 (32.6)	18 (22.8)
	A/A	32 (8.9)	20 (7.1)	12 (15.2)
Αλληλόμορφο	G	548 (75.9)	432 (76.6)	116 (73.4)
	A	174 (24.1)	132 (23.4)	42 (26.6)
<b>rs4800773</b>				
Γονότυπος	G/G	137 (39.5)	104 (38.8)	33 (41.8)
	G/A	161 (46.4)	130 (48.5)	31 (39.2)
	A/A	49 (14.1)	34 (12.7)	15 (19.0)
Αλληλόμορφο	G	435 (62.7)	338 (63.1)	97 (61.4)
	A	259 (37.3)	198 (36.9)	61 (38.6)
<b>rs3875089</b>				
Γονότυπος	T/T	289 (81.0)	226 (80.4)	63 (82.9)
	T/C	61 (17.1)	48 (17.1)	13 (17.1)
	C/C	7 (1.9)	7 (2.5)	0 (0.00)
Αλληλόμορφο	T	639 (89.5)	500 (89.0)	139 (91.4)
	C	75 (10.5)	62 (11.0)	13 (8.6)

Με τη χρήση του προγράμματος Fisher exact test εξετάσθηκε κατά πόσο η κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων που προσδιορίστηκαν βρίσκονταν σε Hardy-Weinberg (H-W) ισορροπία. Βρέθηκε ότι όλοι οι γονότυποι των περιγραφέντων πολυμορφισμών βρίσκονταν σε ισορροπία H-W, με εξαίρεση τους γονοτύπους στον πολυμορφισμό rs3763040 που δεν βρίσκονταν σε ισορροπία H-W ( $p < 0.01$ ). Γι' αυτό και ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν συμπεριλήφθηκε στην περαιτέρω ανάλυση.

Στον πίνακα 5 καταγράφονται οι αναλύσεις των συσχετίσεων των μελετούμενων πολυμορφισμών στους ασθενείς μας, με βάση την κλινική έκβαση εξαμήνου (GOS) – δηλαδή συγκρίνονται οι υποομάδες των ασθενών με ευνοϊκή ή δυσμενή έκβαση, με υπολογισμό των λόγων αναλογιών (odds ratios, ORs) και των αντίστοιχων 95% διαστημάτων εμπιστοσύνης (95% confidence intervals, CIs). Η επίδραση των γονοτύπων και αλληλομόρφων στους συγκεκριμένους φαινοτύπους ελέγχθηκε με βάση το επικρατητικό (dominant) ή υπολειπόμενο (recessive) μοντέλο κληρονόμησης και το μοντέλο αντίθεσης αλληλομόρφων (allele difference). Η σύγκριση καταγράφηκε βάση των μονοπαραγοντικών (univariate) και πολυπαραγοντικών (multivariate) μοντέλων λογιστικής παλινδρόμησης (έγινε σταθεροποίηση για το φύλο, την ηλικία και την GCS εισόδου, όπως έχουμε προαναφέρει).

Με βάση τη διόρθωση Bonferroni για πολλαπλές δοκιμασίες συγκρίσεων, το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας κατέρχεται από 0.05 σε 0.008 (καθώς μελετήθηκαν τελικά 6 SNPs). Κατά συνέπεια, στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν μόνο οι τιμές  $p < 0.008$ .



**Πίνακας 5:** Univariate και multivariate συσχέτιση γενετικών πολυμορφισμών με την εξαμηνια GOS μετά από ΚΕΚ

SNPs	Model	Univariate ανάλυση		Multivariate ανάλυση	
		Ευνοϊκή vs Δυσμενή έκβαση		Ευνοϊκή vs Δυσμενή έκβαση	
		OR(95%CI)	<i>p</i>	OR(95%CI)	<i>p</i>
<b>rs335929</b>	Dom	0.60(0.35-1.02)	0.06	0.49(0.25-1.00)	0.051
	Rec	0.91(0.33-2.52)	0.85	0.80(0.21-3.16)	0.76
	Allele difference	0.71(0.46-1.09)	0.12	0.61(0.35-1.08)	0.09
<b>rs3763043</b>	Dom	2.46(1.47-4.12)	0.0005	2.39(1.25-4.58)	0.008
	Rec	2.91(1.31-6.44)	0.008	5.15(1.60-16.5)	0.006
	Allele difference	2.08(1.42-3.04)	0.0001	2.30(1.38-3.83)	0.001
<b>rs11661256</b>	Dom	1.14(0.58-2.27)	0.68	0.24(0.07-0.75)	0.014
	Rec	-	-	-	-
	Allele difference	1.02(0.54-1.92)	0.93	0.24(0.07-0.75)	0.014
<b>rs335931</b>	Dom	0.55(0.32-0.95)	0.03	0.40(0.19-0.82)	0.012
	Rec	0.58(0.16-2.06)	0.41	0.27(0.05-1.44)	0.126
	Allele difference	0.61(0.39-0.97)	0.039	0.44(0.24-0.82)	0.009
<b>rs4800773</b>	Dom	0.88(0.53-1.47)	0.63	0.96(0.48-1.89)	0.91
	Rec	1.61(0.82-3.14)	0.16	2.18(0.81-5.89)	0.12
	Allele difference	1.07(0.74-1.54)	0.70	1.17(0.72-1.92)	0.51
<b>rs3875089</b>	Dom	0.84(0.43-1.65)	0.62	0.22(0.07-0.65)	0.006
	Rec	-	-	-	-
	Allele difference	0.77(0.42-1.41)	0.39	0.18(0.07-0.50)	0.0009

Από την ανάλυση των πολυμορφισμών δεν προέκυψε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση για τους πολυμορφισμούς rs335929, rs4800773.

Από την ανάλυση του πολυμορφισμού **rs3763043** παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς με ευνοϊκή έκβαση και στους ασθενείς με δυσμενή έκβαση, κατά το επικρατητικό μοντέλο κληρονόμησης (με  $OR=2.46(1.47-4.12)$  και  $p=0.0005$ ) και κατά το μοντέλο αντίθεσης αλληλίων (με  $OR=2.08(1.42-3.04)$  και  $p=0.0001$ ) – η διαφορά επιβεβαιώνεται και κατά την εφαρμογή του πολυπαραγοντικού μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης (επικρατητικό μοντέλο κληρονόμησης:  $OR=2.39(1.25-4.58)$  και  $p=0.008$ ) και μοντέλο αντίθεσης αλληλομόρφων:  $OR=2.30(1.38-3.83)$  και  $p=0.001$ ). Στο υπολειπόμενο μοντέλο κληρονόμησης και με βάση τη διόρθωση Bonferroni ( $p<0.008$ .), καταγράφηκε οριακή στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με λόγο πιθανοτήτων 2.91 (διάστημα εμπιστοσύνης  $(1.31-6.44)$  και  $p=0.008$ ), η οποία ανέρχεται σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας με την εφαρμογή multivariate ανάλυσης (με  $OR=5.15(1.60-16.5)$  και  $p=0.006$ ).

Από την ανάλυση του πολυμορφισμού **rs3875089** καταγράφεται στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς με ευνοϊκή έκβαση και στους ασθενείς με δυσμενή έκβαση, κατά το πολυπαραγοντικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης (επικρατητικό μοντέλο:  $OR=0.22(0.07-0.65)$  και  $p=0.006$  και μοντέλο αντίθεσης αλληλίων:  $OR=0.18(0.07-0.50)$  και  $p=0.0009$ ).

Από την ανάλυση του πολυμορφισμού **rs335931** διαφαίνεται μια τάση για δυσμενή έκβαση με βάση την αντίθεση αλληλομόρφων (με  $OR=0.61(0.39-0.97)$  και  $p=0.039$ ), η οποία ενισχύεται με την εφαρμογή multivariate ανάλυσης (με  $OR=0.44(0.24-0.82)$  και  $p=0.0009$ ). Παρόμοια τάση φαίνεται και στο επικρατητικό μοντέλο κληρονόμησης (με  $OR=0.55(0.32-0.95)$  και  $p=0.03$  – αντίστοιχες τιμές μετά την εφαρμογή multivariate μοντέλου:  $OR=0.40(0.19-0.82)$  και  $p=0.012$ ).

Τέλος, από την ανάλυση του πολυμορφισμού **rs11661256**, με την εφαρμογή του πολυπαραγοντικού μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης, παρατηρείται μια τάση για δυσμενή έκβαση (επικρατητικό μοντέλο:

OR=0.24(0.07-0.75) και  $p=0.014$  / μοντέλο αντίθεσης αλληλομόρφων: OR=0.24(0.07-0.75) και  $p=0.014$ ).

Η ανάλυση απλοτύπων των μελετηθέντων πολυμορφισμών καταγράφεται στον πίνακα 6. Για την ανάλυση μας χρησιμοποιήθηκαν απλότυποι με συχνότητες στο δείγμα των ασθενών  $>0.05$ . Στα αποτελέσματα της ανάλυσης έγινε διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και για πολλαπλές συγκρίσεις κατά Bonferroni.

**Πίνακας 6:** Προβλεπόμενοι απλότυποι με βάση τους AQP4 tag SNPs στις ομάδες ευνοϊκής και δυσμενούς έκβασης ασθενών μετά από ΚΕΚ

				Univariate analysis		Multivariate analysis	
				Ευνοϊκή vs Δυσμενή έκβαση		Ευνοϊκή vs Δυσμενή έκβαση	
Απλότυποι		% καλή έκβαση	% κακή έκβαση	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	P
I	ACTAGT	26.0	21.3	0.99(0.57-1.72)	0.788	1.14(0.55-2.34)	0.71
II	CCTGGT	23.5	13.2	0.56(0.30-1.04)	0.061	0.57(0.26-1.24)	0.15
III	ATTAAT	13.6	13.7	1.05(0.53-2.04)	0.65	1.79(0.67-4.60)	0.24
IV	ACTAAT	10.4	13.8	0.78(0.35-1.65)	0.50	1.99(0.79-4.87)	0.14
V	ACAAAC	8.3	4.0	0.96(0.39-2.29)	0.75	0.43(0.10-1.64)	0.19
<b>VI</b>	<b>ATTAGT</b>	<b>7.4</b>	<b>16.9</b>	<b>3.24(1.74-5.96)</b>	<b>0.00013</b>	<b>2.94(1.34-6.36)</b>	<b>0.0065</b>

Από την ανάλυση των απλοτύπων για τους tag πολυμορφισμούς της AQP4 που μελετήθηκαν, όσον αφορά την εξαμήνη έκβαση των ασθενών μετά από ΚΕΚ, αναγνωρίστηκαν 6 απλότυποι με συχνότητες στο δείγμα  $>0.05$ . Από αυτούς, όπως προέκυψε τόσο από το μονοπαραγοντικό όσο και από το πολυπαραγοντικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης, ο απλότυπος VI (ATTAGT) φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα ευνοϊκής έκβασης των ασθενών, έξι μήνες μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση (με OR=3.24(1.74-5.96) και  $p=0.00013$ , στο univariate μοντέλο και OR=2.94(1.34-6.36) και  $p=0.0065$ , στο multivariate μοντέλο).

## Συζήτηση

Οι ΚΕΚ συνεπάγονται μια σειρά πολύπλοκων δευτεροπαθών αλλοιώσεων που περιλαμβάνουν τη διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, τη δημιουργία οιδήματος, τη μειωμένη αιμάτωση, την απελευθέρωση κυτταροτοξικών ουσιών και την παραγωγή διαφόρων επιβλαβών πρωτεϊνών [17]. Η έκταση της βλάβης του εγκεφάλου μετά από μια ΚΕΚ – καθώς και συνολικά η τελική έκβαση - παρουσιάζει σημαντική ποικιλομορφία, στην οποία εμπλέκονται σε κάποιο βαθμό, τουλάχιστον, γενετικοί πολυμορφισμοί, όπως αναδεικνύεται από όλο και περισσότερες μελέτες.

Στην παθοφυσιολογία της ΚΕΚ ξεχωριστή θέση καταλαμβάνει ο σχηματισμός εγκεφαλικού οιδήματος που μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ενδοκράνια πίεση, εγκολεασμό και θάνατο. Φαινοτυπικές αναλύσεις AQP-4 knock-out ποντικών κατέδειξαν τη συμμετοχή της AQP4 στην ισορροπία ύδατος στον εγκέφαλο [49]. Ποντίκια στα οποία έχει εξαληφθεί το γονίδιο της AQP4 παρουσιάζουν μειωμένο εγκεφαλικό οίδημα και βελτιωμένη νευρολογική έκβαση σε πειραματικά μοντέλα κυτταροτοξικού εγκεφαλικού οιδήματος. Τελευταία, ένας ολοένα αυξανόμενος αριθμός μελετών επικεντρώνεται στην διερεύνηση του ρόλου πολυμορφισμών του γονιδίου της AQP4 στο σχηματισμό ή/και απορρόφηση του εγκεφαλικού οιδήματος, το βαθμό της προκαλούμενης εγκεφαλικής βλάβης και κατά συνέπεια, την κλινική εικόνα και έκβαση ασθενών μετά από μείζονα συμβάματα (όπως οι ΚΕΚ). Ενδεικτικά, έχουμε ήδη αναφέρει τον μη συνώνυμο πολυμορφισμό (nsSNP) rs3906956 (M278T), που είναι από τους πρώτους που περιγράφηκαν και που σχετίζεται με κέρδος λειτουργικότητας της AQP4, καθώς επίσης, και τους 4 νέους μη συνώνυμους πολυμορφισμούς (nsSNPs: I128T, D184E, I205L, M224T - (1-2%) συχνότητα αλληλομόρφων) της πρόσφατης μελέτης των Sorani et al [45], που σχετίζονται με μειωμένη διαπερατότητα του πόρου σε νερό. Ακόμη, οι Kleffner et al., 2008, μελέτησαν 10 AQP4 πολυμορφισμούς σε 41 ασθενείς με αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο λόγω απόφραξης της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας, ταυτοποιώντας έναν πολυμορφισμό (rs 9951307) με πιθανό

προστατευτικό ρόλο έναντι σοβαρού εγκεφαλικού οιδήματος, κατά το επικρατητικό μοντέλο κληρονόμησης ( $p=0.01$ ;  $OR=0.10(0.02-0.49)$ ) [64].

Στη μελέτη μας επιλέχθηκαν να μελετηθούν ως προς την ενδεχόμενη επίδραση τους στην έκβαση ασθενών μετά από ΚΕΚ, οι ακόλουθοι tag πολυμορφισμοί του γονιδίου της AQP4: rs335929, rs3763043, rs11661256, rs335931, rs3763040, rs4800773, rs3875089. Η μελέτη σχεδιάστηκε στη βάση της επιβεβαιωμένης σημασίας στην πορεία μιας κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης, του εγκεφαλικού οιδήματος που παρουσιάζεται, καθώς και της καλά πλέον τεκμηριωμένης συσχέτισης της AQP4 με τη διακίνηση ύδατος στον εγκέφαλο.

Από την παρούσα μελέτη δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ ευνοϊκής και δυσμενούς έκβασης ασθενών έξι μήνες μετά από ΚΕΚ, για τους πολυμορφισμούς rs335929, rs4800773. Ειδικά ο πολυμορφισμός rs335929, δεν φάνηκε να εμπλέκεται σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας ούτε στη δημιουργία σοβαρού εγκεφαλικού οιδήματος μετά από απόφραξη της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας, όπως προέκυψε από άλλη μελέτη [64].

Για τον πολυμορφισμό rs3763043, προέκυψαν σημαντικά στοιχεία συμμετοχής του στο φαινότυπο ασθενών με ΚΕΚ. Συγκεκριμένα, ο ανωτέρω πολυμορφισμός βρέθηκε να επηρεάζει την εξάμηνη έκβαση των ασθενών μετά από ΚΕΚ, σε στατιστικώς σημαντικά επίπεδα. Οι φορείς κατά το επικρατητικό μοντέλο κληρονόμησης, έχουν 2.4 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα ευνοϊκής έκβασης 6 μήνες μετά από ΚΕΚ - πιθανότητα που διατηρείται και κατά την εφαρμογή του multivariate μοντέλου, σε χαμηλότερα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας. Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και όταν συγκρίνουμε τις συχνότητες αλληλομόρφων. Επίσης, στο υπολειπόμενο μοντέλο κληρονόμησης και με βάση τη διόρθωση Bonferroni, καταγράφηκε σημαντική τάση προς συσχέτιση, η οποία ανέρχεται σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας με την εφαρμογή multivariate ανάλυσης.

Από την ανάλυση των πολυμορφισμών rs335931 και rs11661256 με την εφαρμογή του πολυπαραγοντικού μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης, διαφάνηκε μια τάση για δυσμενή έκβαση των ασθενών 6 μήνες μετά από ΚΕΚ, κατά το μοντέλο αντίθεσης αλληλομόρφων και κατά το επικρατητικό μοντέλο.

Ειδικά για τον πολυμορφισμό rs11661256, σε μελέτη σχετικά με τη δημιουργία σοβαρού οιδήματος μετά από απόφραξη της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας, δεν επιβεβαιώθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση [64], γεγονός που, γενικότερα, κάνει φανερή την ανάγκη συνεχιζόμενης διερεύνησης του ρόλου των διαφόρων πολυμορφισμών της AQP4 στη διακίνηση ύδατος στον εγκέφαλο και στις παθολογικές καταστάσεις που περιπλέκονται από τη δημιουργία εγκεφαλικού οιδήματος.

Να αναφερθούμε ακόμη και στην στατιστικώς σημαντική διαφορά που καταγράφεται όσον αφορά τον rs3875089 πολυμορφισμό, ανάμεσα στους ασθενείς με ευνοϊκή έκβαση και στους ασθενείς με δυσμενή έκβαση, κατά το πολυπαραγοντικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης (επικρατητικό μοντέλο και μοντέλο αντίθεσης αλληλομόρφων) και που υποσημαίνει αυξημένο κίνδυνο δυσμενούς εξάμηνης έκβασης των ασθενών μετά από ΚΕΚ.

Αξίζει να σημειώσουμε τη μελέτη των Romeiro et al., 2007 κατά την οποία διερευνήθηκε κατά πόσον η κλινική εικόνα και η έκβαση ασθενών μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση, θα μπορούσε να επηρεαστεί από μεταλλάξεις, συγκεκριμένα, στο εξόνιο 4 του γονιδίου της AQP4. Εκτιμήθηκαν συνολικά 102 ασθενείς, χωρίς να βρεθεί κάποιος πολυμορφισμός του γονιδίου που να σχετίζεται με το δημιουργούμενο εγκεφαλικό οίδημα και την ΚΕΚ. Παρά το αρνητικό αυτό αποτέλεσμα, η ισχυρή εμπλοκή της AQP4 στη ρύθμιση του εγκεφαλικού οιδήματος και κατ' επέκταση στην κρανιοεγκεφαλική κάκωση, είναι πλέον δεδομένη και η παρουσία τέτοιων μελετών τονίζει ακόμα περισσότερο τη σημασία της πληρέστερης διερεύνησης του γονιδίου της AQP4, σε μεγαλύτερα δείγματα ασθενών [65]. Ο τελικός σκοπός είναι, συνολικά, η καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας των ΚΕΚ και του ρόλου διαφόρων γονιδιακών τόπων, όπως αυτού των ακουαπορινών.

Τέλος, στην παρούσα μελέτη, από την ανάλυση απλοτύπων διαπιστώθηκε η επίδραση του απλότυπου VI (ATTAGT) στην εξάμηνη έκβαση των ασθενών με ΚΕΚ, με τους φορείς του συγκεκριμένου απλότυπου να παρουσιάζουν περισσότερες πιθανότητες για καλύτερη μακροχρόνια έκβαση και στο μονοπαραγοντικό και στο πολυπαραγοντικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης.

## Συμπεράσματα

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ένας μεγάλος αριθμός μελετών που αφορούν την παθοφυσιολογία της ΚΕΚ και τους παράγοντες που μπορούν να καθορίσουν την έκβαση των ασθενών. Επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν αναδείξει έναν αριθμό γενετικών πολυμορφισμών, οι οποίοι συνεισφέρουν στην ευαισθησία για δυσμενή ή μη έκβαση μετά από ΚΕΚ.

Το εγκεφαλικό οίδημα αποτελεί έναν «παράγοντα κλειδί» για τη θνησιμότητα και τη θνητότητα μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση. Η ανακάλυψη των ακουαπορινών και, κατεξοχήν, της AQP4, συνέβαλλε καθοριστικά στην κατανόηση των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη δημιουργία/απορρόφηση του εγκεφαλικού οιδήματος [22]. Έτσι, είναι πλέον τεκμηριωμένος ο ρόλος της AQP4 στη δημιουργία κυτταροτοξικού εγκεφαλικού οιδήματος από τη μια, και την απορρόφηση του πλεονάζοντος ύδατος σε αγγειοκινητικό οίδημα, από την άλλη.

Προχωρώντας παραπέρα, ένα μεγάλο κομμάτι της γενετικής έρευνας εστιάζεται τα τελευταία χρόνια στη διερεύνηση του ρόλου πολυμορφισμών της AQP4 στην κλινική πράξη. Για παράδειγμα, θα μπορούσαν συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί στους ανθρώπους να έχουν παρόμοια προστατευτικά αποτελέσματα με εκείνα που καταγράφονται κατά την απουσία AQP4 σε ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί το σχετικό γονίδιο, όπου παρατηρείται μειωμένο εγκεφαλικό οίδημα και βελτιωμένη νευρολογική έκβαση σε καταστάσεις κυτταροτοξικού εγκεφαλικού οιδήματος [45]. Επίσης, επιδημιολογικές μελέτες έχουν ανιχνεύσει διαφορές μεταξύ εθνικοτήτων όσον αφορά την έκβαση μετά από ΚΕΚ που θα μπορούσαν να οφείλονται σε διαφορετικά αλληλόμορφα ποικίλων γονιδίων [45]. Η ανίχνευση και ο ακριβής προσδιορισμός των επιπτώσεων των πολυμορφισμών της AQP4 θα μπορούσε να οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας της σημαντικής αυτής πρωτεΐνης (και των ακουαπορινών γενικότερα) και, κυρίως, των κλινικών επιπτώσεών της. Σημαντικό κομμάτι, τέλος, παραμένει η ανάδειξη της AQP4 σε δυνητικά θεραπευτικό στόχο για τη μείωση του εγκεφαλικού οιδήματος σε ασθενείς με ΚΕΚ ή αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο.

## Βιβλιογραφία

- 1) Raghupathi R, McIntosh TK, Cellular responses to experimental brain injury, Brain Res Mol Brain Res. 1996 Apr;37(1-2):134-44.
- 2) Hayes RL, Yang K, Raghupathi R, McIntosh TK. Changes in gene expression following traumatic brain injury in the rat, J Neurotrauma. 1995 Oct;12(5):779-90. Review
- 3) McIntosh TK. Neurochemical sequelae of traumatic brain injury: therapeutic implications. Cerebrovasc Brain Metab Rev. 1994 Summer;6(2):109-62. Review.
- 4) McIntosh TK, Smith DH, Meaney DF, Kotapka MJ, Gennarelli TA, Graham DI. Neuropathological sequelae of traumatic brain injury: relationship to neurochemical and biomechanical mechanisms. Lab Invest. 1996 Feb;74(2):315-42. Review.
- 5) Perry VH, Bolton SJ, Anthony DC, Betmouni S. The contribution of inflammation to acute and chronic neurodegeneration, Res Immunol. 1998 Sep-Oct;149(7-8):721-5. Review
- 6) Holmin S, Söderlund J, Biberfeld P, Mathiesen T. Intracerebral inflammation after human brain contusion. Neurosurgery, 1998 Feb;42(2):291-8; discussion 298-9.
- 7) Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, Stahel PF, Kossmann T. Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept, Shock. 2001 Sep;16(3):165-77. Review.
- 8) Martin N. A., Patwardhan R. V., Alexander M. J., Africk C. Z., Lee J. H., Shalmon E., Hovda D.A., Becker D. P. Characterization of cerebral hemodynamic phases following severe head trauma: hypoperfusion, hyperemia, and vasospasm, J Neurosurg 1997;87:9-19
- 9) Bergsneider M, Hovda DA, Shalmon E, Kelly DF, Vespa PM, Martin NA, Phelps ME, McArthur DL, Caron MJ, Kraus JF, Becker DP. Cerebral hyperglycolysis following severe traumatic brain injury in humans : a positron emission tomography study. J Neurosurg, 1997 Feb;86(2):241-51



- 10) Signoretti S, Marmarou A, Tavazzi B, Lazzarino G, Beaumont A, Vagnozzi R. N-Acetylaspartate reduction as a measure of injury severity and mitochondrial dysfunction following diffuse traumatic brain injury. *Neurotrauma*. 2001 Oct;18(10):977-91.
- 11) Sinson G, Bagley LJ, Cecil KM, Torchia M, McGowan JC, Lenkinski RE, McIntosh TK, Grossman RI. Magnetization transfer imaging and proton MR spectroscopy in the evaluation of axonal injury: correlation with clinical outcome after traumatic brain injury. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2001 Jan;22(1):143-51
- 12) Katayama Y, Becker DP, Tamura T, Hovda DA. Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. *J Neurosurg*. 1990 Dec;73(6):889-900. Review.
- 13) Palmer AM, Marion DW, Botscheller ML, Swedlow PE, Styren SD, DeKosky ST. Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. *J Neurochem*. 1993 Dec;61(6):2015-24.
- 14) Bullock R, Zauner A, Woodward JJ, Myseros J, Choi SC, Ward JD, Marmarou A, Young HF. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J Neurosurg*. 1998 Oct;89(4):507-18.
- 15) Marklund N, Clausen F, Lewander T, Hillered L. Monitoring of reactive oxygen species production after traumatic brain injury in rats with microdialysis and the 4-hydroxybenzoic acid trapping method. *J Neurotrauma*. 2001 Nov;18(11):1217-27
- 16) Kampfl A, Posmantur R, Nixon R, Grynspan F, Zhao X, Liu SJ, Newcomb JK, Clifton GL, Hayes RL.  $\mu$ -calpain activation and calpain-mediated cytoskeletal proteolysis following traumatic brain injury. *J Neurochem*. 1996 Oct;67(4):1575-83.
- 17) Saatman KE, Graham DI, McIntosh TK. The neuronal cytoskeleton is at risk after mild and moderate brain injury. *J Neurotrauma*. 1998 Dec;15(12):1047-58.

- 18) Saatman KE, Murai H, Bartus RT, Smith DH, Hayward NJ, Perri BR, McIntosh TK. Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 16;93(8):3428-33.
- 19) Posmantur R, Kampfl A, Siman R, Liu J, Zhao X, Clifton GL, Hayes RL. A calpain inhibitor attenuates cortical cytoskeletal protein loss after experimental traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience*. 1997 Apr;77(3):875-88.
- 20) Badaut J., Ashwal S., Obenaus A. Aquaporins in Cerebrovascular Disease: A Target for Treatment of Brain Edema? *Cerebrovasc Dis* 2011;31:521–531.
- 21) Barzo P., Marmarou A., Fatouros P., Hayasaki K., Corwin F. Contribution of vasogenic and cellular edema to traumatic brain swelling measured by diffusion-weighted imaging, *J Neurosurg* 1997; 87: 900-7
- 22) Miao Xu, Wei SU, Qiu-ping Xu. Aquaporin-4 and traumatic brain edema. *Chinese Journal of Traumatology* 2010; 13(2):103-110
- 23) Araque A. Astrocyte-neuron signaling in the brain—implications for disease. *Curr Opin Investig Drugs* (2006) 7:619–624.
- 24) Liang D, Bhatta S, Gerzanich V, Simard JM (2007) Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurg Focus* 22:E2.
- 25) Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, Papadopoulos MC (2008) Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci* 31:37–43.
- 26) Lang EW, Chesnut RM. Intracranial pressure and cerebral perfusion pressure in severe head injury. *New Horiz* (1995) 3:400–409.
- 27) Czosnyka M, Hutchinson PJ, Balestreri M, Hiler M, Smielewski P, Pickard JD. Monitoring and interpretation of intracranial pressure after head injury. *Acta Neurochir Suppl* (2006) 96:114–118

- 28) Czosnyka M, Smielewski P, Timofeev I, Lavinio A, Guazzo E, Hutchinson P, Pickard JD. Intracranial pressure: more than a number. *Neurosurg Focus* (2007) 22:E10.
- 29) King, L.S, Kozono D, Agre P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporine biology. (2004) *Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.*, 5, 687-698.
- 30) Buffoli Barbara. Aquaporin Biology and Nervous System, *Curr.Neuropharmacology* 2010, 8, 97-104.
- 31) Wu B, Beitz E. Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. *CellMol Life Sci* 2007; 64(18): 2413-2421.
- 32) Gonen T, Walz T: The structure of aquaporins. *Q Rev Biophys* 2006; 39: 361–396.
- 33) Zsolt Zador, Orin Bloch, Xiaoming Yao and Geoffrey T. Manley, Aquaporins: role in cerebral edema and brain water balance. *Progress in Brain Research*, Vol. 161
- 34) Guillermo L. Lehmann, Sergio A. Gradilone and Raúl A. Marinelli, Aquaporin Water Channels in Central Nervous System. *Current Neurovascular Research*, 2004, 1, 293-303.
- 35) Ikeda M., Beitz E., Kozono D., Cuggino W.B., Agre P., Yasui M. (2002) Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells. *J.Biol.Chem.*, 277, 39873-39879.
- 36) Jung J.S., Preston G.M., Smith B.L., Guggino W.B., Agre P. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J. Biol. Chem.* (1994) 269, 14648–14654.
- 37) Gunnarson E, Axehult G, Baturina G, Zelenin S, Zelenina M, Aperia A. Lead induces increased water permeability in astrocytes expressing aquaporin 4. *Neuroscience* (2005) 136:105–114.
- 38) Bonomini Francesca, Rita Rezzani, Aquaporin and Blood Brain Barrier. *Current Neuropharmacology*, 2010, 8, 92-96
- 39) Verkman A.S, Binder Devin K., Bloch Orin, Auguste Kurtis, Papadopoulos Marios C. Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 (2006) 1085–1093.

- 40) Bloch Orin, Manley Geoffrey T. The role of aquaporin-4 in cerebral water transport and edema, *Neurosurg Focus* 22 (5):E3, 2007.
- 41) Lu M, Lee MD, Smith BL, Jung JS, Agre P, Verdijk MA, Merckx G, Rijss JP, Deen PM The human AQP4 gene: definition of the locus encoding two water channel polypeptides in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) 93:10908–10912.
- 42) Crane JM, Van Hoek AN, Skach WR, Verkman AS. Aquaporin-4 dynamics in orthogonal arrays in live cells visualized by quantum dot single particle tracking. *Mol Biol Cell* (2008) 19:3369–3378.
- 43) Furman CS, Gorelick-Feldman DA, Davidson KG, Yasumura T, Neely JD, Agre P, Rash JE. Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100:13609–13614.
- 44) Silberstein C, Bouley R, Huang Y, Fang P, Pastor-Soler N, Brown D, Van Hoek AN. Membrane organization and function of M1 and M23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* (2004) 287:F501–F511.
- 45) Sorani Marco D, Zador Zsolt, Hurowitz Evan, Yan Donghong, Giacomini Kathleen M. and Geoffrey T. Manley. Novel variants in human Aquaporin-4 reduce cellular water permeability, *Hum Mol Genet*. 2008 August 1; 17(15): 2379–2389.
- 46) Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Krishna S, Bell BA. Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2002b) 72:262–265.
- 47) Badaut J, Brunet JF, Grollmund L, Hamou MF, Magistretti PJ, Villemure JG, Regli L. Aquaporin 1 and aquaporin 4 expression in human brain after subarachnoid hemorrhage and in peritumoral tissue. *Acta Neurochir Suppl* (2003) 86:495–498.
- 48) Warth A, Kroger S, Wolburg H. Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae. *Acta Neuropathol* (2004) 107:311–318.

- 49) Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* (2000) 6:159–163.
- 50) Solenov, E., Watanabe, H., Manley, G.T., Verkman, A.S. Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. (2004) *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 286, C426-C432.
- 51) Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem* (2005) 280:13906–13912.
- 52) Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, Eid T, de Lanerolle NC, Nagelhus EA, Adams ME, Froehner SC, Agre P, Ottersen OP Delayed K<sup>+</sup> clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003b) 100:13615–13620.
- 53) Amiry-Moghaddam M, Xue R, Haug FM, Neely JD, Bhardwaj A, Agre P, Adams ME, Froehner SC, Mori S, Ottersen OP. Alphasyntrophin deletion removes the perivascular but not endothelial pool of aquaporin-4 at the blood–brain barrier and delays the development of brain edema in an experimental model of acute hyponatremia. *FASEB J* (2004b) 18:542–544.
- 54) Zeynalov E, Chen CH, Froehner SC, Adams ME, Ottersen OP, Amiry-Moghaddam M, Bhardwaj A. The perivascular pool of aquaporin-4 mediates the effect of osmotherapy in postischemic cerebral edema. *Crit Care Med* (2008) 36:2634–2640.
- 55) Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J* (2004) 18:1291–1293.
- 56) Bloch O, Papadopoulos MC, Manley GT, Verkman AS. Aquaporin-4 gene deletion in mice increases focal edema associated with staphylococcal brain abscess. *J Neurochem* (2005) 95:254–262.

- 57) Ke C, Poon WS, Ng HK, et al. Heterogeneous responses of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats. *Neurosci Lett* 2001; 301(1):21-24.
- 58) Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E, Tamatani M, Kobayashi A, Yokawa T, Maruno M, Kato A, Ohnishi T, Kohmura E, Tohyama M, Yoshimine T Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal ischemia in rat. *Mol Brain Res* (2000) 78:131–137
- 59) Sun MC, Honey CR, Berk C, et al. Regulation of aquaporin-4 in a traumatic brain injury model in rats. *J Neurosurg* 2003; 98 (3):565-569.
- 60) Zhao J, Moore AN, Clifton GL, et al. Sulforaphane enhances aquaporin-4 expression and decreases cerebral edema following traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 2005; 82(4):499-506.
- 61) Neal CJ, Lee EY, Gyorgy A, et al. Effect of penetrating brain injury on aquaporin-4 expression using a rat model. *J Neurotrauma* 2007; 24(10):1609-1617.
- 62) Hirt L, Price M, Ternon B, Mastour N, Brunet JF, Badaut J: Early induction of AQP4 contributes the limitation of the edema formation in the brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29: 423–433.
- 63) De Castro Ribeiro M, Hirt L, Bogousslavsky J, Regli L, Badaut J: Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Res* 2006; 83: 1231–1240.
- 64) Kleffner I., Bungeroth, M. Schiffbauer, H. Schabitz, W. R. Ringelstein, E.B. Kuhlenbaumer, G. The role of aquaporin-4 polymorphisms in the development of brain edema after middle cerebral artery occlusion, *Stroke* 2008, 39:1333-133
- 65) Romeiro RR, Romano-Silva MA, De Marco L, Teixeira AL Jr, Correa H. Can variation in aquaporin 4 gene be associated with different outcomes in traumatic brain edema? *Neurosci Lett*. 2007, 16;426(2):133-4.

- 66) Kuwahara M, Gu Y, Ishibasi K, Marumo F, Sasaki S. Mercury- sensitive residues and pore site in AQP3 water channel. (1997) *Biochemistry*,36, 13973-13978.